

تمرينات عملية في

علم الكائنات الحية الدقيقة

الجراثيم

الأستاذ الدكتور صالح حمد بعيو

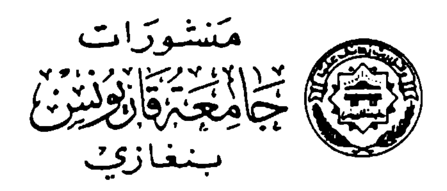
منشورات
جامعة قاريونس
بنغازي - ليبيا




منتدى إقراء الثقافي

تمرينات عملية في
علم الكائنات الحية الدقيقة
الجراثيم

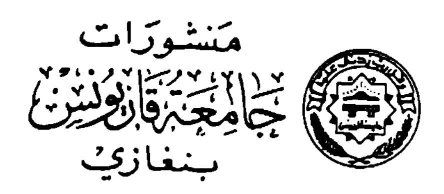
تأليف
الأستاذ الدكتور صالح حمد بعيو
قسم النبات ـ كلية العلوم



رقم الإيداع : 5171 / 2002 ف
ردمك 9 - 078 - 24 - 9959 ISBN

الوكالة الليبية للترقيم الدولي الموحد للكتاب
دار الكتب الوطنية / بنغازي - ليبيا
هاتف : 9090509- 9096379 - 9097074
بريد مصور : 9097073
البريد الإلكتروني : nat-lib-libya@ hotmail.com

الطبعة الأولى 2003



المؤلف في سطور:

تحصل المؤلف على درجة البكالوريوس والماجستير من جامعة - Eberhard - Karls Universität بمدينة توبنجن Tübingen بألمانيا الغربية عام 1977 في مجال علوم الكائنات الدقيقة Microbiology وكان عنوان أطروحة الماجستير:

«Optimierung der Ketomycin-und 3 - Cyclohhexenylglycinproduktion bei Streptomyces Tendae Ettlinger».

ثم التحق بقسم النبات ـ كلية العلوم ـ جامعة قاريونس بمدينة بنغازي كعضو هيئة التدريس عام 1978، واصل دراسة الدكتوراه عام 1979 بالولايات المتحدة الأمريكية وتحصل على درجة الدكتوراه ph. D. أيضاً في مجال علوم الكائنات الدقيقة من جامعة شمال ولاية تكساس North Texas State University بمدينة دنتون Denton عام 1985 وكان عنوان بحث الدكتوراه:

«Degradation of Humic Substances by aquatic Bacteria»

نشرت له عدة بحوث في مجال علوم الكائنات الدقيقة (البكتيريا) في عدة مجلات محلية وخارجية كما أشرف على عدة طلبة ماجستير. مجالات اهتمامه: البكتيريا الطبية Medical Bacteriology، المضادات الحيوية Antibiotics والتحلل الحيوي Biodegradation. يشغل درجة أستاذ Prof. بقسم النبات منذ عام 1995.

المقدمة

نظراً لما يعانيه طلبتنا من صعوبات في فهم مواد العلوم الأساسية Basic Sciences وخاصة علم الأحياء الدقيقة Microbiology، قمت بتقديم هذا الكتاب «تمرينات عملية في علم الكائنات الحية الدقيقة: الجراثيم» ليساعد الطلبة في الوطن العربي على فهم الأحياء الدقيقة عامة وفهم الطرق المعملية المختلفة للتعرف على هذه الكائنات الدقيقة. أثناء تدريس عدة مقررات في علوم الأحياء الدقيقة ومن خلال خبرتي في السنوات الأخيرة بقسم النبات ـ كلية العلوم ـ جامعة قاريونس، إتضح لي أن الطالب العربي في حاجة ماسة إلى كثير من التوضيحات مثل الرسومات، كذلك إلى البساطة في العرض حتى يتمكن من فهم المادة وهذا ما رأيته في هذا الكتاب.

يتضمن هذا الكتاب تمرينات معملية Laboratory exercises في علم الأحياء الدقيقة لطلبة الشهادة الجامعية الأولى Undergraduate Students في مجال الدراسات الصحية Health Sciences ، الزراعة Agriculture، والبيئة Ecology وكذلك لطلبة إعداديات الطب البشري Premedical Students وطلبة إعدادي طب الأسنان Predental Students و البيطرة Veterinary medicine والتمريض Nursery والأحياء الدقيقة Microbiology والأحياء Biology بوجه عام. إن هذا الكتاب اليدوي يزود الطالب بشرح نظري مطوّل بعض الشيء عن كل تمرين وذلك قبل البدء في إجراء التمرين موضحاً فيه الأسباب الهامة وراء كل تمرين عملي. هذا الكتاب يزود الطالب والمدرس بالتمرينات العملية لفهم أهمية الكائنات الحية الدقيقة Microorganisms في البيئة المحيطة بنا (البيئة الميكروبية، التحاليل الصحية للمياه، أهمية الميكروبات في الزراعة، في الصناعة. . . إلخ).

لم أشمل في هذا الكتاب أي تمرينات حول الأحياء الدقيقة الطبية Medical Microbiology لقناعتي بأن هذه التمرينات يجب أن يجريها الطالب بعد أن يكون قد أتقن العمل بالميكروبات في المعمل حتى يكون على حذر تام عند التعامل مع البكتيريا الممرضة Pathogenic Bacteria. لهذا يجب على كل من يعمل في معامل علوم الأحياء الدقيقة اتباع احتياطات السلامة حتى يتجنب خطر العدوى Risk of Infections ولقد اكتفيت فقط في هذا المجال بالتحدث عن بعض الطفيليات الممرضة (الباب التاسع).

وفي نهاية كل تمرين يوجد أسئلة على التمرين، الإجابة عليها بعد الانتهاء من إجراء التمرين يسهل عليك فهم التمرين. كما أتمنى أن يستفيد طلبتنا من هذا العمل المتواضع للمكتبة والأمل كبير في أن تتبعه بعون الله أعمال أخرى في مجال علوم الجراثيم (الميكروبات).

قبل كل شيء أتقدم بالشكر الخاص لجميع أفراد عائلتي على التشجيع المستمر لإخراج هذا الكتاب. كما لا يفوتني أن أتقدم بالشكر إلى الأستاذة سعاد علي بالنور والأستاذ فتحي علي عطية على المساعدة في إعداد رسومات الأشكال في هذا الكتاب.

وأخيراً أعتذر عن الأخطاء فالكمال لله وحده والأخطاء ناتجة سهواً أو مطبعياً.

د. صالح حمد بعيو

بنغازي في

المحتويات

إحتياطات السلامة في معامل الجراثيم

Safety Regulations for the Microbiology Laboratory

بعض القواعد والتنظيمات للسلامة في المعامل Laboratories يمكن اعتبارها موحدة في الكثير من المؤسسات. في المؤسسات العلمية المدرس عادة يزود الطالب بهذه المعلومات. القواعد الآتية يجب اتباعها حتى تحمي نفسك وكل شخص له صلة بالمعمل:

1. طهر Disinfect مكان العمل قبل البدء في التمرينات المعملية وبعد الانتهاء من العمل.
2. إغسل يديك قبل البدء في العمل في المعمل وحالاً قبل ترك المعمل.
3. يجب عدم التدخين والشرب والأكل في المعمل ولا تضع أشياء مثل قلم الرصاص، ورق اللصق، الماصات أو غيرها في فمك.
4. إلبس الحذاء في المعمل في كل الأوقات. كما ينصح بلبس معطف المعمل Lab coat أو المريلة Apron.
5. الشعر الطويل يمكن أن يلمس اللهب مما ينتج عنه خطورة، كذلك يمكن أن يسبب في تلوث المزارع Culture أو العكس، الميكروبات تنتقل إلى الشعر. لذا يجب على الطالبات لف الشعر الطويل إلى الخلف أثناء العمل في معمل الأحياء الدقيقة.
6. ضع الكتب والحاجات الأخرى الخاصة بك بعيداً عن طاولة العمل، هذا يخلق مكاناً واسعاً للعمل ويقلل من انتقال العدوى عن طريق هذه الأشياء.
7. لا ترمِ أبداً أوراقاً أو مواد معملية ترغب في التخلص منها في سلة

المهملات أو في الأحواض. هذه المواد مثل الماصات Pipets، صحون بتري Petri dishes، أنابيب الاختبار Test tubes أو أوراق Papers والتي تحتوي على مزارع جرثومية، يجب التخلص منها كل في إناء خاص به.

8. لا ترمِ مواد زجاجية مكسورة في سلة المهملات.
9. ضع الماصات الزجاجية (قابلة للاستعمال ثانية) بحيث تكون مقدمتها إلى أسفل في أسطوانة الماصات المحتوية على مطهر Disinfectant.
10. لا تضع أكثر من ثلاثة صحون بتري متراكمة على بعضها على أرفف الحاضنة Incubator حتى لا تتساقط في الحاضنة وخاصة عند فتح باب الحاضنة.
11. غطِّ أي محاليل ميكروبية متناثرة بقطعة من منديل ورق والمشبعة بمطهر واتركها لمدة 15 دقيقة، ثم ضع المنديل في إناء مناسب وطهر المكان الملوث.
12. أخبر مدرسك بأي تلوث جرثومي يحدث في المعمل أثناء قيامك بالتجارب المعملية.
13. أكتب على كل أنبوبة اختبار تحتوي على مزرعة أو طبق بتري به مزرعة البيانات الآتية:
    - التاريخ
    - رقم التمرين
    - المحتويات
    - إسمك
14. لا تنسَ تدوين جميع نتائج التجارب والتعليق عليها والإجابة على الأسئلة في نهاية كل تمرين.
15. إغسل يديك جيداً بالماء والصابون قبل مغادرة المعمل.

الباب الأول

إستعمال الأجهزة والمعدات

Use of Equipment

تحضير الأوساط المغذية

Preparing culture media

الحصول على مزارع من الكائنات الحية الدقيقة في المعمل يتطلب مواد مغذية nutrients وبيئة مناسبة. المواد المغذية هي تلك المواد التي تحتاجها هذه الكائنات لبقائها حية، وتحفزها على النمو وتكوين مكونات الخلية وتزودها بالطاقة اللازمة للتفاعلات الأيضية Metabolic Reactions والحركة Motility.

يتم تزويد الكائنات الدقيقة بهذه المواد عن طريق الأوساط المزرعية المختلفة Culture Media. الوسط المزرعي عامة يحتوي على الماء، مصدر للطاقة ومصادر مغذية مناسبة من الكربون، النتروجين، الفوسفور، الأكسجين، الهيدروجين وكذلك بعض المعادن بتراكيز قليلة Trace elements. لهذه المواد الأساسية يمكن إضافة محفزات النمو (مثل الفيتامينات، والأحماض الأمينية)، أو مواد أخرى حسب الكائن الدقيق المراد نموه.

الأوساط المزرعية يمكن أن تكون على شكل سائل أو حساء Broth أو صلبة Solid. الأوساط الصلبة يمكن الحصول عليها بإضافة مادة الأجار Agar

وهو عبارة عن نشا معقد Complex polysaccharide يعزل من الطحالب الحمراء البحرية Rhodophycophyta. مادة الأجار تعتبر الأفضل في تحضير الأوساط المزرعية الصلبة Solid Culture Media نظراً لمزايا هذه المادة، ومن أهمها:

1. الكائنات الحية الدقيقة (بكتيريا وفطريات) لا تحلل هذه المادة، أي لا تتغذى عليها لعدم احتوائها على أنزيم Agarase.

2. تبقى مادة الأجار في حالة هلامية jelled في مجال واسع من درجات الحرارة (1 درجة حتى 95 درجة مئوية) وهذا يسمح بنمو الكائنات الدقيقة التي تفضل درجات حرارة عالية Thermophilic Microorganisms.

3. يتحول الاجار إلى سائل عند درجة حرارة غليان الماء وفي نفس الوقت لا يرجع إلى الحالة الصلبة إلاَّ عند هبوط درجة حرارته إلى حوالي 42 درجة مئوية. الخاصية الأخيرة لمادة الأجار تجعل من السهل الحصول على خليط من الكائنات الدقيقة (بكتيريا) والأجار عند درجة حرارة 45 درجة مئوية دون قتل هذه الكائنات. مادة الأجار تضاف عادة بنسبة 1.2% إلى 2.0% (w/v) للأوساط السائلة لكي تجعلها صلبة.

الأوساط المزرعية المحضرة تكون عادة ملوثة بكائنات حية دقيقة جاءت عن طريق المواد المغذية Nutrients، الماء، الأواني المستعملة في التحضير أو عن طريق الأيدي أو الهواء، لهذا يجب تعقيم هذه الأوساط قبل البدء في زرع أي كائن دقيق في أو على هذه الأوساط Media. يمكن ملاحظة هذا التلوث عند ترك هذه الأوساط بدون تعقيم لعدة أيام بظهور نموات على سطح هذه الأوساط. لذلك زرع كائنات دقيقة على أوساط مزرعية مغذية غير معقمة يترك السؤال مطروحاً: هل النمو جاء من الكائنات الدقيقة المزروعة والمراد دراستها أو من كائنات أخرى جاءت بطريقة من الطرق المذكورة أعلاه ولوثت

الوسط. التعقيم في هذه الحالة هو إذاً قتل أو فصل جميع الكائنات الحية الدقيقة من وسط غذائي مزرعي. بعد التعقيم من الأفضل ترك الصحون المحتوية على الوسط في درجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة قبل الزرع عليها للتأكد من عدم تلوثها بميكروبات أثناء صب الوسط المعقم في هذه الصحون المعقمة.

الأوساط المغذية والمحتوية على مادة الأجار Agar المنصهر يمكن وضعها في أنابيب اختبار في وضع مائل وبعد تصلب الأجار نكون قد تحصلنا على مساحة كبيرة للزرع Agar Slants (شكل 1). غير أن استعمال صحون بتري Petri Dishes هو الأكثر انتشاراً خاصة لزرع البكتيريا والفطريات حيث المساحة الكبيرة وسهولة الاستعمال. كل الأواني المحتوية على أوساط مغذية يجب تغطيتها بالقطن Cotton أو بغطاء معدني أو من اللدائن (شكل 2).

نوع الوسط المغذي لعمل مزرعة بكتيرية يحدد نوع البكتيريا المراد زرعها ومكونات هذا الوسط يساعد في عزل مستعمرات بكتيرية نقية. هناك نوعان رئيسيان من الأوساط المغذية (بناء على التركيب الكيميائي) تستعمل عادة في معامل الجراثيم:

1. الأوساط التركيبية المحددة المكونات Chemically - defined or synthetic Media (جدول 1).
2. الأوساط المعقدة Complex Media (جدول 2).

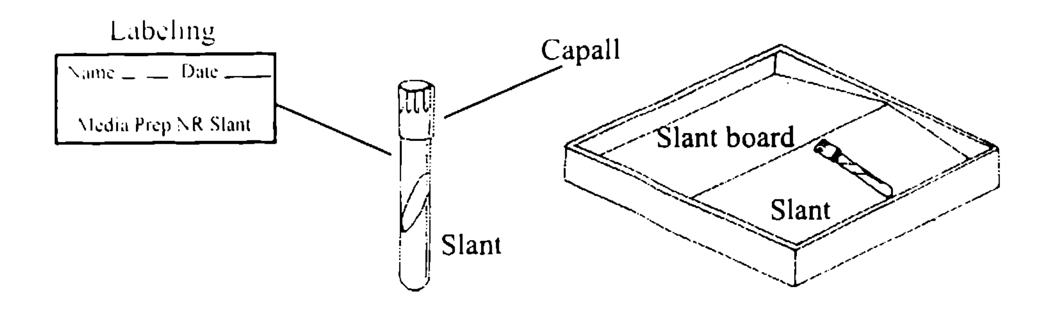
أولاً ـ الأوساط التركيبية:

الأوساط المغذية التركيبية (جدول 1) تحضر في المعمل بحيث تعرف مكوناتها الكيميائية وكذلك وزن كل مركب (التركيز). الأجزاء المقومة Ingredients التي تتركب منها هذه الأوساط وهي أملاح لا عضوية ومركبات

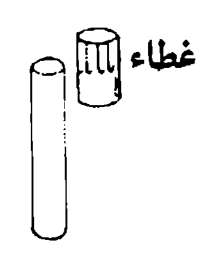
عضوية بسيطة تعتبر ذات نقاوة عالية Reagent Grade . الأوساط المغذية التركيبية تستعمل عادة في بعض الدراسات على الكائنات الدقيقة مثل علم الوظائف Physiology والوراثة Genetics .

جدول (1). وسط مغذي تركيبي ووظيفة مكوناته

رقم	المادة المغذية Nutrient	الكمية Amount	الوظيفة Function
1	جلوكوز Glucose	2.0 جرام	مصدر للكربون والطاقة
2	فوسفات ثنائي البوتاسيوم K_2HPO_4	1.0 جرام	مصدر للفوسفور
3	كلوريد الأمونيوم NH_4Cl	0.5 جرام	مصدر للكلور والنتروجين
4	كبريتات المغنيسيوم $MgSO_4 . 7H_2O$	0.2 جرام	مصدر للكبريت والماغنسيوم
5	كلوريد الحديد $FeCl. 6H_2O$	0.005 جرام	مصدر للكلور والحديد
6	ماء مقطر Dist. Water .	1000 مل	



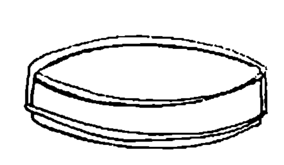
شكل (1). أنابيب الوسط المغذي يجب تمييزها بدقة ثم توضع على لوحة خاصة لجعلها مائلة Slant board قبل تصلب الأجار بها.



أنبوبة مزرعة عادية بغطاء



أنبوبة مزرعة حلزونية بغطاء



صحن بتري فارغ

شكل (2). بعض أنواع أواني المزارع.

تمرين (1):

تحضير وسط مغذي يحتوي على الجلوكوز كمصدر وحيد للكربون والطاقة: Preparation of a Glucose - Mineral Salts Broth

المواد: Materials

- المواد المغذية كما في الجدول (1)
- ماء مقطر
- أنابيب اختبار
- ماصات 10 مل
- إناء زجاجي Erlenmeyer Flask حجم 250 مل.

الطريقة: Procedure

حضّر 100 مل فقط من الوسط المغذي التركيبي حسب الكميات في الجدول (1).

1. أضف 75 مل من الماء المقطر Distilled water في الإناء الزجاجي الخاص بالأوساط المغذية Erlenmeyer Flask وذات حجم 250 مل.

2. أضف مكونات الوسط المغذي التركيبي Ingredients حسب الترتيب

(جدول 1) وحرك بعد كل إضافة حتى تذاب المكونات تماماً. أضف بعد ذلك الكمية الثانية من الماء المقطر (25 مل) وذلك لغسل جدار الإناء الزجاجي الداخلي.

3. وزع 10 مل من هذا الوسط المغذي السائل في كل أنبوبة اختبار (10 أنابيب) وذلك باستعمال ماصة ذات حجم 10 مل واقفل الأنابيب. الأنبوبة المقفلة بإحكام معرضة للانفجار في جهاز التعقيم Autoclave أثناء التعقيم.

4. ضع أنابيب الاختبار المحتوية على الوسط المغذي التركيبي في السلة Basket أو حافظة الأنابيب Rack بعد كتابة المعلومات كما في الشكل (1) (الاسم، التاريخ، نوع الوسط، . . . إلخ). ضع السلة أو الحافظة في جهاز التعقيم وابدأ في التعقيم.

ثانياً: الأوساط المغذية المعقدة:

الأوساط المغذية المعقدة (جدول 2) تحضر عن طريق نواتج طبيعية Natural Products غير معروف تركيبها الكيميائي. أمثلة لمصادر هذه المواد المغذية المعقدة هي عصارة لحم البقر Beef Extract، بروتينات نباتية وحيوانية مغلية Infusions. بعض الأوساط المغذية تضاف إليها مكونات أخرى مثل الدم Blood، مصل الدم Serum، فيتامينات Vitamins أو أحماض أمينية Amino Acids والتي تحتاج إليها أنواع معينة من الكائنات الدقيقة لكي تنمو Fastidious Microorganisms. المكونات وتركيزاتها في الوسط الغذائي المعقد غير معروفة. هذه الأوساط المعقدة تستعمل بكثرة في معامل الأحياء الدقيقة Microbiological Laboratories لأنها سهلة التحضير ورخيصة وتساعد في نمو أغلب البكتيريا والفطريات.

جدول (2). وسط مغذي معقد **Chemically - Complex Medium**

رقم	المقومات أو المادة المغذية Ingredient	الكمية	الوظيفة
1	بيتون Peptone	5.0 جرام	مصدر الأحماض الأمينية
2	كلوريد الصوديوم NaCl	8.0 جرام	مصدر للصوديوم
3	مستخلص لحم بقر Beef Extract	3.0 جرام	مصدر للفيتامينات واحتياجات النمو الأخرى
4	ماء مقطر Dist. H_2O	1000 مل	

تمرين (2)

تحضير الحساء المغذي أو الأجار المغذي

Preparation of Nutrient Broth or Nutrient Agar:

المواد: Materials

- المواد المغذية كما في الجدول (2)
- ماء مقطر
- أنابيب اختبار
- ماصات معقمة حجم 10 مل
- إناء زجاجي Erlenmeyer Flask حجم 250 مل.

الطريقة: Procedure

حضر 100 مل فقط من الحساء المغذي Nutrient Broth متبعاً الكميات كما في جدول (2):

1. في زجاجة Erlenmeyer Flask ذات حجم 250 مل أضف 75 مل من الماء المقطر.
2. أضف المقومات الثلاث Ingredients وحرك في كل مرة، ثم أضف

الكمية الباقية من الماء المقطر (25 مل) وذلك لغسل جدار الزجاجة الداخلي والخلط جيداً.

3. وزع 10 مل من هذا الحساء المغذي في كل من 10 أنابيب اختبار باستعمال الماصة وأقفل الأنابيب بالقطن أو غيرها.
4. لتحضير الأجار المغذي Nutrient Agar إتبع نفس الخطوات وأضف 1.5 جرام (1.5%) من الأجار Agar إلى كمية الحساء (100 مل).
5. سخن الأجار المغذي حتى الغليان (تجنب الانسكاب من الزجاجة).
6. وزع الأجار المغذي في أنابيب الاختبار أو اتركه في الزجاجة (هذا يعتمد على نوع التمرين).
7. ضع كل الزجاجات والأنابيب المحتوية على الحساء المغذي أو الأجار المغذي بعد تغطيتها في جهاز التعقيم Autoclave وابدأ في التعقيم.

أسئلة:

1. ما المقصود بالوسط المزرعي وما هي أنواعه؟
2. من أين نحصل على مادة الأجار؟
3. لماذا يفضل الأجار على غيره في تحضير الأوساط المزرعية الصلبة؟
4. لماذا تعقم الأوساط المزرعية قبل استعمالها؟

التعقيم Sterilization

يقصد بالتعقيم هو عملية قتل Killing أو إبعاد Removal كل الكائنات الحية الدقيقة (البكتيريا والفطريات) المتواجدة في الأدوات أو المواد سواء كانت على شكل خضري Vegetative أو في حالة أبواغ Spores وكذلك الفيروسات.

يوجد خمسة (5) أنواع من طرق التعقيم:

1. طرق تعتمد على الحرارة Heat.

2. طرق تعتمد على استعمال المواد الكيميائية Chemicals.

3. طرق تستعمل فيها الغازات Gases.

4. طرق تعتمد على استعمال الإشعاع Radiation.

5. طرق تعتمد على إبعاد الميكروبات بواسطة الترشيح Filtration.

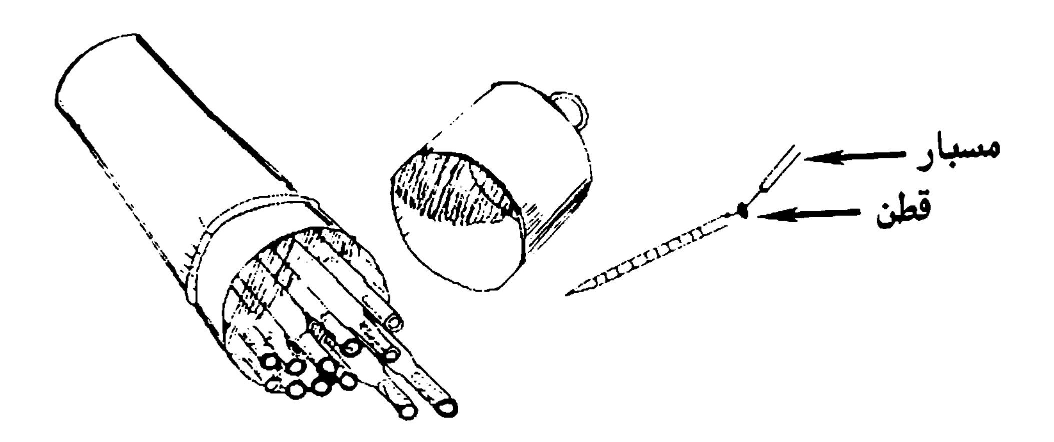
أولاً: التعقيم بالحرارة: Sterilization by heat

(أ) التعقيم بالحرارة الجافة Dry Heat.

بالرغم من أن التعقيم بالحرارة الرطبة (في وجود بخار الماء) ذات فعالية أكثر إلاً أن لكل من الحرارة الجافة والحرارة الرطبة استعمالاتها. ميكانيكية القتل بالحرارة الجافة هي قدرتها على أكسدة Oxidation البروتوبلازم. هناك عدة طرق للتعقيم بالحرارة الجافة.

(أ) ـ (1) التعقيم في فرن الهواء الساخن Hot Air Oven.

وهي طريقة التعقيم في الهواء الساخن في فرن Oven حيث توضع الأدوات والأواني المراد تعقيمها مثل: أنابيب الاختبار Test tubes والماصات Pipettes (شكل 3) والزجاجيات Glasswares في جهاز شبيه بالفرن العادي في درجة حرارة 170 درجة مئوية لمدة ساعتين. هذه المدة الطويلة وهي الساعتان مطلوبة نظراً لأن التعقيم هنا بدون بخار ماء أي جاف حيث أن التعقيم في وجود بخار الماء ذا فعالية أكبر ولا يحتاج إلى زمن طويل.



شكل (3) الماصات Pipets تعقم في علبة الماصات. المسبار Stylet يستعمل لتمرير بعض من القطن في مقدمة كل ماصة.

(أ) - (2) الحرارة الحمراء في لهب بنزن Red Heat in the Bunsen Flame

وتستعمل هذه الطريقة في تعقيم أسلاك التلقيح Inoculating wires وإبر التلقيح ذات الحلقة Inoculating Loops (Needles) وذلك بالتسخين في اللهب لدرجة الاحمرار أو الحريق Incineration. كما قد تستخدم هذه الطريقة في تعقيم المعدات المعدنية التي لا تتلف بالحرارة، وكذلك لتعقيم الشرائح الزجاجية Slides بتمريرها في اللهب مباشرة.

(أ) - (3) التلهيب بعد الغمس في الكحول Flaming after Dipping in Ethanol

وتجري هذه الطريقة بغمس الأداة في الكحول ثم إشعالها وتستعمل في حالة تعقيم المشارط Scalpels، الملاوق Spatulae والمواد الأخرى التي لا يمكن تسخينها لدرجة الاحمرار، كما يعقم بهذه الطريقة أيضاً الهاون بإضافة بعض القطرات من الكحول ثم إشعالها وكذلك تعقيم يد الهاون بنفس الطريقة.

(ب) التعقيم بالحرارة الرطبة (في وجود بخار الماء) Sterilization by heat in the Presence of Moisture

يوجد عدة طرق للتعقيم بالحرارة الرطبة Moist Heat وهذه الطرق تشمل:

(ب) ـ (1) الغليان في حمام مائي: Boiling Water Bath

تستعمل هذه الطريقة لتعقيم بعض الأشياء مثل قنينات رضاعة المواليد حيث تغلى هذه القنينات لمدة 5 إلى 10 دقائق في إناء خاص به ماء مقطر أو ماء عذب (نسبة الأملاح قليلة)، وتجدر الإشارة إلى أن هذه الطريقة كافية لقتل الخلايا الخضرية Vegetative Cells بينما تظل الأبواغ البكتيريا Endospores بلا تأثير.

(ب) ـ (2) معقم كوخ التجاري Koch's Steam Sterilizer

إن التعقيم في معقم كوخ التجاري والذي يسمى «Steamer» تقوم فكرته على أساس التعقيم بالبخار عند الضغط الجوي وعند درجة غليان الماء (100 درجة مئوية عند الضغط الجوي العادي). معقم كوخ التجاري يستخدم في تعقيم الأوساط المغذية Media أو المكونات التي تفسد عند تعرضها لدرجات حرارة أعلى من 100 درجة مئوية مثل الأوساط المحتوية على السكريات، جيلاتين أو لبن.

هذا المعقم البخاري يمكن استخدامه بطريقتين:

1. التعريض لمرة واحدة Single Exposure لدرجة 100 مئوية لمدة 90 دقيقة.

2. التسخين المتقطع Intermittent Heating وهي عملية التندلة Tyndallisation وذلك بالتسخين عند درجة 100 مئوية لمدة 30 دقيقة مع التكرار على مدار ثلاثة أيام متتالية، أي أنه باختصار نجري تعريض

الأوساط للبخار لمدة 30 دقيقة يومياً على ثلاثة أيام متعاقبة Consecutive. ويرجع تكرار عملية التسخين 3 مرات إلى أن الخلايا الخضرية Vegetative Cells تقتل في أول مرة، وتحضن الأوساط على درجة الحرارة المزمع العمل عليها لمدة 24 ساعة لكي تعطي الفرصة لأبواغ البكتيريا لكي تنبت Germinate ثم تعرض مرة أخرى للحرارة لقتلها، ويجري التسخين للمرة الثالثة للتأكد من قتل جميع الميكروبات. لذلك تسمى هذه الطريقة أيضاً بالتعقيم المتقطع Intermittent Sterilization.

(ب) ـ (3) التعقيم بالبخار تحت الضغط Sterilization by Steam Under Pressure

تعتبر هذه العملية أحسن وأسرع وسائل التعقيم لقدرة الحرارة الرطبة Moist Heat على الاختراق Penetration حيث تخترق الفيروسات، خلايا البكتيريا، الأبواغ داخل البكتيريا Bacterial Endospores، الفطريات وجميع البروتوبلازم الحية. وتعتمد ميكانيكية فعل الحرارة الرطبة هنا على تغيير التركيب الطبيعي للبروتينات Protein Denaturation وهدمه بطريقة غير عكسية Irreversible. التعقيم بهذه الطريقة يقتل الأبواغ المعروفة بتحملها لدرجات حرارة عالية ـ Heat Resistant. وللقيام بهذا النوع من التعقيم يستعمل جهاز يسمى الأوتوكليف Autoclave (شكل 4). وجهاز التعقيم هذا عبارة عن أسطوانة معدنية متينة لكي تتحمل الضغط، وبداخلها يوضع الماء المقطر ثم توضع المواد والأدوات المراد تعقيمها على أرفف خاصة. ويوجد للجهاز غطاء خاص مركب عليه:

1. صنبور للتخلص من الهواء بداخل الجهاز.
2. مقياس الضغط Pressure Gauge.
3. صمام أمان Safety Valve.

4. مقياس تنظيم الحرارة Thermostat.

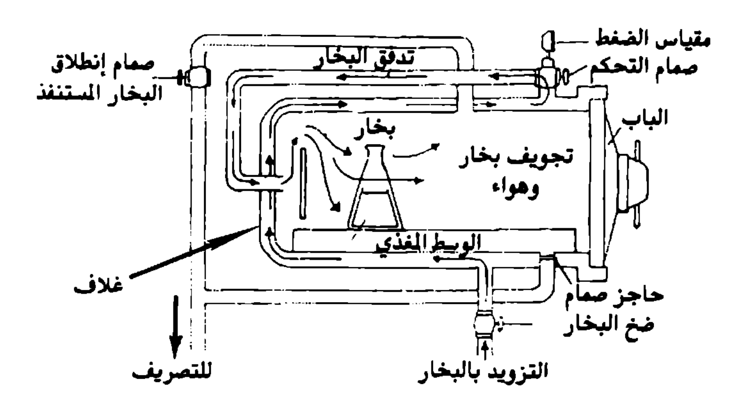
ولتشغيل الجهاز بعد وضع المواد المراد تعقيمها بداخله يقفل الغطاء ويحكم قفله جيداً ثم يسخن الماء باستعمال الكهرباء أو الغاز على أن يكون الصنبور مفتوحاً لخروج الهواء، وعند خروج البخار يقفل الصنبور فيرفع الضغط على المانومتر إلى الضغط المطلوب وبالتالي الحرارة المطلوبة، ومن المعروف أن الماء يغلي عند درجة حرارة 100 مئوية تحت الضغط الجوي العادي. وترتفع هذه الدرجة إذا ارتفع الضغط داخل الوعاء الذي يوجد به الماء.

ويجب عند تشغيل الأوتوكليف ضرورة خلوه تماماً من الهواء قبل قفل الصنبور لأن وجود بعض الهواء مع البخار يقلل من درجات الحرارة التي يمكن الوصول إليها. كما أن وجود الهواء يقلل (أو يمنع) من قدرة البخار على التخلل Steam Penetration، ويقلل من فرص التسخين المتساوي في جميع أجزاء الأوتوكليف المختلفة. ويجب عدم الإسراع في فتح الأوتوكليف قبل وصول الضغط إلى صفر حتى لا تغلي الأوساط السائلة بشدة، وتفور نتيجة لوجودها على درجة أعلى من 100 مئوية فتفشل عملية التعقيم.

الأشياء التي يمكن تعقيمها في جهاز الأوتوكليف تشمل:

1. معظم الأوساط المغذية Nutrient Media التي تتحمل درجات حرارة مرتفعة مثل Nutrient Agar وأجار السابورويد Sabouraud.
2. الشاش والقماش والملايات والأردية البيضاء والقطن والسدادات المطاطية.
3. الأواني والقنينات الزجاجية وأنابيب الاختبار الزجاجية والماصات.
4. السوائل المختلفة التي تتحمل درجات حرارة عالية.
5. كما يستعمل جهاز الأوتوكليف في إعدام والتخلص من مزارع البكتيريا والفطريات الممرضة بعد انتهاء العمل بها.

6. وكذلك تستخدم طريقة التعقيم بالبخار تحت الضغط هذه تجارياً في تعقيم الأغذية المعلبة.



شكل (4). جهاز التعقيم بالبخار Autoclave.

وعادة يجري التعقيم في الأوتوكليف على 15 رطل/ بوصة مربعة لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة 121 مئوية. وعلى أية حال فإن مدة التعقيم عند أية درجة حرارة يعتمد على مجموعة عوامل منها:

1. الكثافة الميكروبية المتوقعة بالمادة التي يجري تعقيمها وكذلك طبيعة الملوثات. بعض الجراثيم شديدة المقاومة للحرارة والمميزة لأفراد جنس Bacillus قد تكون مصاحبة للأوساط المغذية.

2. حجم الأوعية التي تعقم وسمك جدرانها.

3. طبيعة المحتويات فوجود الأجار يزيد من الوقت اللازم لتخلل الحرارة إلى ضعف الوقت اللازم لذات الغرض مع الماء. ولقد وجد أن القضاء على الجراثيم الداخلية المقاومة للحرارة بدرجة عالية يحتاج إلى 70 دقيقة على درجة 115 مئوية في حين يكفي مدة 3 دقائق فقط في درجة 125 مئوية لذات الغرض؛ فكلا المعاملين يؤدي نفس الغرض أي أنه كلما

ارتفعت درجة الحرارة يقل الوقت اللازم لإبادة نفس القدر من الكثافة الميكروبية، وهذا ما تشير له فكرة المعاملات المتكافئة Equivalent Treatments.

(ب) ـ (4) المكثف The Inspissator

وتستخدم هذه الطريقة في تحضير الأوساط مثل Loeffler's Serum (التي تستعمل لتنمية الطفيليات الحيوانية صعبة الإنماء Fastidious Animal Parasites). هذه الأوساط تحضر كالآتي: مرق مغذٍ يحتوي على 1% جلوكوز Glucose (250 مل) ومصل دم معقم Sterile Serum (750 مل) ثم توزع في أنابيب توضع في وضع مائل على أرفف أو حوامل خاصة لهذا الغرض وترفع درجة الحرارة ببطء إلى أن تصل 85 مئوية وتضبط عند هذه الدرجة لمدة ساعتين، الأمر الذي يؤدي إلى تصلب الوسط تماماً. وعندما تكون عملية التجلط Coagulation غير مرغوبة تستعمل في هذه الحالة درجات حرارة منخفضة Low Temperatures (56 درجة مئوية تقريباً، لمدة ساعة واحدة)، مع تكرار هذه العملية يومياً لمدة ثمانية أيام متعاقبة. عموماً فإن من أبسط الطرق المتبعة في التعقيم بالحرارة الواطئة هو تعقيم أمصال الدم Blood Sera والمواد البروتينية التي يخشى من تجلطها باستعمال درجات الحرارة العالية.

(ب) ـ (5) البسترة Pasteurization

هذه الطريقة ابتكرها لأول مرة العالم الفرنسي لويس باستور Louis Pasteur ولذلك سميت باسمه. لمنع تلف مشروب البيرة والنبيذ Sickness or Spoilage of Beer and Wine جرب باستور التسخين المعتدل لقتل الكائنات الدقيقة التي كانت مسئولة عن نوع معين من هذا الفساد.، ولقد نجح في هذا دون أن يحدث أية أضرار على الطعم كنتيجة للمعاملة الحرارية. أصبحت الطريقة متبعة الآن لحماية الألبان من الفساد وسميت الألبان المعاملة بهذه الطريقة الألبان المبسترة. في البداية كانت تتم بسترة اللبن بتعريضه للحرارة

عند 63 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة. أما اليوم فلقد تطورت العملية وصارت تجري عند 72 درجة مئوية لمدة 15 ثانية وهي ما تعرف بالبسترة قصيرة المدة عالية الحرارة High - Temperature Short - Time (HTST) Pasteurization

ثانياً: التعقيم بالكيماويات Sterilization by Chemicals

تستعمل المطهرات الكيميائية Chemical Disinfectants أساساً في تطهير الجلد عند تعاطي الحقنة مثلاً، حيث تستعمل مطهرات خاصة بالأنسجة الحية تسمى Antiseptics. كذلك تستعمل المطهرات في تطهير الأرضيات، المباني والمعدات وطاولات العمل وغيرها حيث لا يمكن تسخين هذه الأشياء بدون تلف. في المعامل الميكروبية ومعامل التحاليل الطبية الأخرى فإن الماصات Pipettes والتحضيرات المجهرية على الشرائح الزجاجية المحتوية على خلايا حية Living Cells يمكن استبعادها في برطمانات Jars مليئة بالمطهرات، وأية مزارع ميكروبية تراق (أو تتبدد) في المعمل يمكن أن تغطى بقطن مشبع بمطهر قبل إزالتها. وتستعمل بعض المطهرات Volatile Antiseptics مثل الكلوروفورم والتولوئين في منع النمو (أو التعقيم) في بعض المحاليل الغذائية مثل مصل الدم الذي يستعمل لتحضير الأوساط وذلك بإضافة المطهر Antiseptic بنسبة 0.25% ثم التخلص منه بتسخينه على حمام مائي على درجة 56 مئوية حتى يتطاير الكلوروفورم.

وتستعمل بعض المواد الكيمائية مثل الفينول Phenol بتركيز 5% والكريسول Cresol بتركيز 5% أيضاً لتعقيم الأدوات الجراحية وكذلك المزارع البكتيرية المراد التخلص منها. ويستخدم فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2 وفوق أكسيد الزنك Zinc Peroxide كمطهرات للجروح العميقة حيث لهما فعل تثبيطي للبكتيريا اللاهوائية. ويستعمل محلول السليماني Mercuric Chloride بتركيز 0.1% (مرسب للبروتينات، أي مطهر) للتعقيم السطحي للعقد الجذرية عند عزل البكتيريا المثبتة للنتروجين الجوي Nitrogen - Fixing Bacteria

المتواجدة في العقد الجذرية لبعض النباتات، وكذلك تعقيم درنات البطاطس عند عزل الميكروبات المرضية الموجودة بداخلها، كما تطهر الطاولة Bench التي عليها الأطباق Petri Dishes بالعمل بمحلول مائي (5%) من الفينول Phenol أو بالكحول (70% إيثانول) حيث تتلخص ميكانيكية فعل الفينول أو الايثانول في تمزيق الغشاء البلازمي، تغيير التركيب الطبيعي Denaturation للبروتينات، ووقف نشاط الأنزيمات Enzyme Inactivity. كما يمكن تعقيم الهواء المحيط برشه برذاذ Spray من محلول الفينول بواسطة رشاشة دقيقة الثقوب وتطهير الأيدي بالكحول.

ثالثاً: التعقيم بالغازات Sterilization by Gases

المعقمات الكيماوية الغازية Gaseous Chemosterilizers هي عبارة عن كيماويات تقوم بالتعقيم في غرفة مغلقة شبيهة بالأوتوكليف. ومن الغازات المناسبة لهذه الطريقة أكسيد الإيثيلين Ethylene Oxide ويعتمد نشاطه على تغيير التركيب الطبيعي Denaturation للبروتينيات من خلال التأثير على المجاميع الفعالية المحتوية على ذرات هيدروجين غير مستقرة مثل SH —، حيث يحدث إحلال المجاميع الكيلية Alkyl Groups محل ذرات الهيدروجين غير المستقرة Labile Hydrogens.

وينجح أكسيد الإيثيلين في قتل جميع الميكروبات والأبواغ الداخلية Endospores. ولكونه سام وقابل لإحداث انفجار Explosive وهو في الحالة النقية، فإنه عادة يخلط بغاز خامل Inert Gas مثل N_2 أو CO_2، وإحدى مزاياه الرئيسة تتلخص في قدرته الفائقة على التخلل (النفاذية). ومع أن المواد يجري تعريضها لأكسيد الإيثيلين لمدة 4 ـ 18 ساعة، فإن قدرته التخللية الفائقة تعد سبباً قوياً في اختياره لتعقيم المركبة الفضائية التي ترسل للهبوط على سطح القمر والكواكب، حيث أن استخدام الحرارة لتعقيم الجهاز الإلكتروني في تلك المركبات لم يكن عملياً.

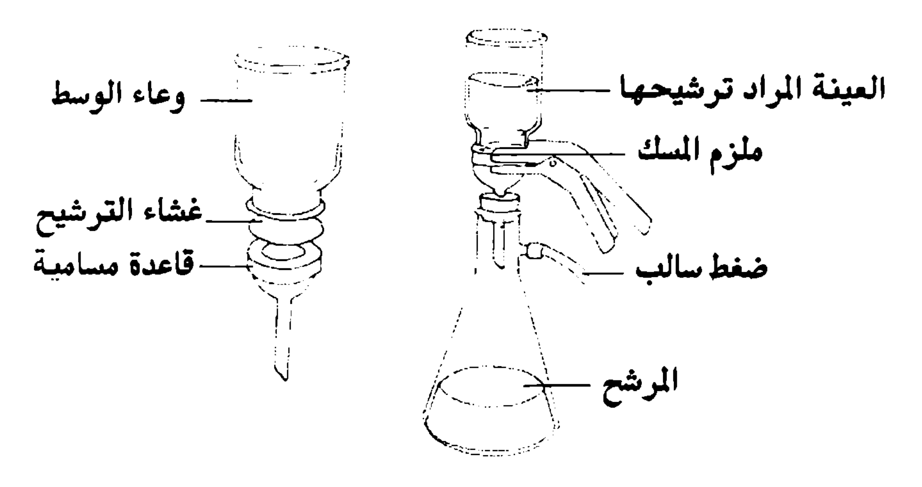
وبسبب فعاليتها في التعقيم بدون حرارة فإن هذه الغازات تستعمل على نطاق واسع في الإمدادات الطبية والمعدات. فالقدرة التخللية Penetrating Power لغاز أكسيد الإيثيلين تيسر التعقيم البارد Cold Sterilization للأدوات البلاستيكية (اللدائن). والأمثلة على استخدامات هذه الغازات تشمل الأدوات المعقمة الجاهزة الاستعمال كالسرنجات Syringes وصحون بتري Petri Dishes وصمامات القلب الصناعية، والقسطرات Catheters وماكينات القلب والرئتين... إلخ. الكثير من المستشفيات الكبيرة والصناعات الدوائية تكون مزودة بغرف لأوكسيد الإيثيلين كجزء من معدات التعقيم بهذه الأماكن. أما غاز الفورمالدهايد HCHO فقد كان يستعمل فيما مضى لتبخير غرف المستشفيات ولم يعد الآن يستعمل على نطاق واسع.

كما أن أكسيد البروبيلين Propylene Oxide وبتا - بروبيولاكتون - Beta Propiolactone يستخدمان في التعقيم الغازي، وأيضاً فإن الغاز الأول منهما يستخدم في تطهير الأجزاء النباتية المزمع استخدامها كوسط طبيعي لنمو بعض الفطريات وذلك من خلال تقطيع الجزء النباتي على هيئة شرائح رقيقة ترطب قليلاً بالماء وتوضع في إناء زجاجي محكم الغطاء، ثم يوضع في الوعاء أكسيد البروبيلين (1 مل/ لتر فراغ) ويغلق الوعاء جيداً ويترك لمدة 24 ساعة ثم يفتح الغطاء قليلاً ليسمح للغاز بالتسرب (لمدة عدة ساعات). ثم توضع الشرائح بواسطة ملقط معقم في وسط الأجار المغذي المعقم وهو لا يزال سائلاً مما يساعد على التخلص من بقايا المادة الغازية. وتجدر الإشارة إلى أن غاز - beta - propiolactone أكثر خطورة على الصحة حيث أن له أثراً مسرطناً.

رابعاً: التعقيم بالترشيح Sterilization by Filtration

يمكن تعقيم الهواء والغازات بتمريرها في أنابيب تحتوي على قطع معقمة من القطن أو محتوية على مسحوق السكر أو الرمل. ولقد استعمل التعقيم بالترشيح منذ سنوات القرن الثامن عشر للتخلص من البكتيريا في

السوائل، ولا يزال يستعمل حتى اليوم. فالسوائل والمحاليل Solutions والأوساط التي يخشى عليها من التحلل إذا عقمت بالحرارة يستخدم في تعقيمها المرشحات البكتيريولوجية Bacteriological Filters (شكل 5). كما تستخدم هذه المرشحات في الأغراض العلمية لحجز البكتيريا ومرور السوائل التي يراد عزل الفيروسات Viruses منها حيث يمكن للأخيرة أن تمر خلال المرشحات Filterable Organisms. وتنحصر نظرية التعقيم باستخدام المرشحات في أن هذه المرشحات تحمل شحنات كهربائية وقوى سطحية Surface Forces. أي أن حجز Retention الميكروبات الملوثة ينشأ عن Adsorption + Electrostatic Attractions من شأنها ادمصاص Adsorption البكتيريا على سطحها. وتعتبر هذه الشحنات هي المسئولة أولاً عن عملية حجز البكتيريا، أما صغر حجم مسام Pores هذه المرشحات فتأثيره قد يكون ثانوياً حيث ثبت أنه بمعاملة المرشحات بمواد تعادل أو تحجب الشحنات الموجودة عليها مثل السيرم Serum، الدهون Lipids، البروتينات Proteins، فإن ذلك يجعل البكتيريا تمر خلال مسام المرشحات بدون أن تحجز.



شكل (5). معدات الترشيح Filtration

ومن أنواع المرشحات Filters السائدة لمثل هذه الأغراض:

1. **الشمعات الخزفية Earthenware Candles**: وهذه مثل مرشحات بيركيفلد Berkefeld Filter وتشمبرلاند Chamberland Filter حيث كانت من أوائل أدوات التعقيم بالترشيح ولو أنه الآن قلت مجالات استعمالاتها.

وتستعمل في مرشح Chamberland شمعة مصنوعة من الخزف غير المصقول Unglazed Porcelain Candle مفتوحة من طرف ومقفولة من الطرف الآخر. ولاستعماله في الترشيح توضع الشمعة في قارورة Flask بإحكام على أن يكون الطرف المفتوح إلى أعلى (خارج القارورة) ويصب السائل المراد تعقيمه بها على أن يجري شفط أو سحب Suction الهواء من القارورة بواسطة وصلة Connection بمضخة تفريغ Suction Pump على أن تعقم القارورة والشمعة قبل الاستعمال في جهاز الأوتوكليف Autoclave.

أما مرشح Berkefeld فهو عبارة عن شمعة مصنوعة من أغلفة الدياتوما Diatomaceous Earth مع الأسبستوس (الحرير الصخري) Asbestos وهي مفتوحة من طرف ومقفلة من الطرف الآخر، وتوضع عادة داخل قارورة (دورق) Flask على أن تكون الفتحة داخل الدورق، ويحيط بالشمعة غلاف زجاجي Mantle. ولتعقيم البيئة (الوسط) باستخدام هذا المرشح يصب الوسط في الفراغ بين الغلاف الزجاجي والشمعة على أن يجري سحب (شفط) الهواء من القارورة فيمر الوسط Medium إلى القارورة وتحجز البكتيريا على سطح الشمعة.

2. **مرشحات الأسبستوس Asbestos Filters**: هناك تشكيلة جيدة من هذه المرشحات تتدرج عن بعضها في مساميتها Graded Porosities فالبعض منها يستخدم في عمليات الترويق Clarification والبعض الآخر في التعقيم Sterilization. وبالرغم من أن هذه النوعية من المرشحات كانت من أكثر الأنواع شيوعاً إلى عهد قريب في تعقيم الأوساط المغذية Nutrient Media

وكذلك المواد التكميلية للأوساط Supplements إلاً أن المرشحات الغشائية Membrane Filters قد طغت عليها وحلت الآن محلها.

ومن أمثلة هذه المرشحات Seitz Filters وفيه يمرر الوسط خلال قرص من الأسبستوس. ويستعمل لذلك الغرض قارورة يركب عليها المرشح المحتوي على القرص مع ملاحظة تعقيم القارورة والمرشح وبداخله القرص قبل الاستعمال في جهاز الأوتوكليف على ضغط 20 رطل/ بوصة مربعة لمدة 20 دقيقة. تجري عملية سحب (أو شفط) الهواء من القارورة عن طريق توصيله بمضخة تفريغ، فيمر السائل خلال القرص معقماً إلى القارورة.

3. **المرشحات الغشائية** Membrane Filters: وهذه تصنع من مواد كيميائية مثل خلات السيلولوز عالية المسامية Highly Porous، ويوجد منها تشكيلة جيدة تتدرج في المسامية فيما بينها. وتقوم ميكانيكية احتجاز هذه الأغشية للجزئيات المرشحة على خاصية أحجام المسام التي يكون أكبر حجم منها أقل من أصغر جزيء بسائل الترشيح، أي أن خاصية الاحتجاز للجزيئات هنا تقوم على حجم المسام وليس على الجذب الإلكتروستاتيكي Electrostatic Attraction أو الامتصاص Adsorption (كما في حالة مرشحات الأسبستوس).
وللتعقيم البكتريولوجي للأوساط المغذية تستخدم مرشحات دقيقة المسامية:

Millipore Grade GS (pre size 0.22 μ m ± 0.02 μ m)

Millipore Grade VS (pre size 0.025 μ m ± 0.003 μ m)

(هذا ويجب تعقيم المرشح والأجزاء الأخرى في الأوتوكليف قبل استعماله وبعد استعمال المرشحات يجب تنظيفها، فالشمعة المصنوعة من السيليكا تحرق لدرجة الاحمرار وذلك لحرق المواد العضوية الممتصة (تحرق في اللهب أو في فرن عالي الحرارة Muffle Furnace). أما في حالة مرشح بيركيفلد فتنظف الشمعة باستعمال ماء مضغوط عكس اتجاه الترشيح، أما في حالة مرشح سيتز Seitz فيجب الاستغناء عن القرص واستخدام آخر.

خامساً: التعقيم بالإشعاع Sterilization by Radiation

من المعروف أن بعض الإشعاعات Radiation قد تحدث تأثير مميتاً للمكروبات عموماً، حيث أنه ثبت أن امتصاص الطاقة الإشعاعية بواسطة الخلايا ينتج عنه إما تأثير مميت Lethal Effect للخلايا طبقاً لنظام لوغاريتمي أو إلى حدوث طفرات في الخلايا. وهذه الإشعاعات تشمل الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet (UV) Rays وهي من الأشعة غير المؤينة Nonionizing والأشعة السينية القصيرة Short X-Rays (Roentgen Rays) والأشعة المعروفة بأشعة جاما Gamma Rays وهي أشعة كهرومغناطسية مؤينة Ionizing Electromagnetic Radiations والأشعة الجزيئية Particle Rays والتي تسمى أحياناً بأشعة بيتا β – *Rays* والتي تنتج عن الإلكترونات سريعة الحركة، وكذلك الأشعة الناتجة عن تفجير نويات الهليوم Helium Nuclei والتي تسمى بأشعة ألفا alpha-Rays. يمكن تفسير ميكانيكية فعل الأشعة فيما يلي:

1. إن الإشعاعات المؤينة تحدث تأثيراً مباشراً Direct Hit لمناطق حساسة من الخلايا تعرف بالأهداف الحساسة Sensitive Targets، تطبيقاً للنظرية التي وضعت لهذا التفسير وتسمى «Target Theory of Action» والقائلة بأنِ جزيء الطاقة الإشعاعية Radiant - Energy Particle يمتص في هذه المناطق وبالتالي يتغير تركيبها الجزيئي كنتيجة لحدوث تأين بها. وتعتبر المحتويات النووية لهذه المنطقة أكثرها تأثيراً ـ هذا علاوة على ما هو معروف من أن المحتويات النووية ذات قدرة عالية على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية. والمعروف أن الإشعاع المؤين Ionizing Radiation يعد أحد العوامل الهامة التي تجبر الإلكترونات على الهجرة من مداراتها Shells مخلفة وراءها أيونات محملة بشحنات فعالة وذات فعل هدمي.

2. إن الإشعاعات تحدث تأيناً لما تحتويه الخلايا من الماء ومن جزيئات الأكسجين التي تتواجد في منطقة مرور الأشعة في الخلية، وإن ما ينتج عن

أيونات يتفاعل مع مكونات الخلية. وهذه الأيونات التي تنتج بفعل الإشعاعات وعلاوة على تلك المركبات السامة التي تتكون بتأثيرها تجتمع بفعاليتها لقتل الخلايا.

ولقد تم التعرف على منطقتين بالخلايا البكتيرية، حساستين لفعل الإشعاعات: المنطقة الأولى هي الأنزيمات الموجودة بالستوبلازم الخلوي والمسئولة عن التفاعلات الأيضية المختلفة، والمنطقة الثانية هي الأجسام النووية والتي تتحكم في تكوين السيتوبلازم بأنزيماته المختلفة والتي أيضاً تتحكم في انتقال القدرات الأنزيمية إلى الأجيال المتعاقبة. وهناك من الأدلة ما يثبت قدرة الإشعاعات على تثبيط الأنزيمات الميكروبية المعزولة من الخلايا. إن عملية التثبيط هذه تحدث نتيجة لأكسدة البروتينات الأنزيمية وبخاصة من خلال مجاميع السلفهيدريل SH- وكذلك على إمكانية حدوث التأثير المباشر Direct Hit على المحتويات السيتوبلازمية. وفيما يتعلق بالمنطقة الثانية بالخلية وهي منطقة المحتويات النووية فإن ما يحدث لها من تغيرات نتيجة الإشعاعات يشمل الفعلين المذكورين (الفعل التأكسدي + التأثير المباشر)؛ فلقد وجد أن الجرعات المميتة من الإشعاعات يمكنها إحداث عملية حل المكثورات Depolymerization وكسور لجزئيات DNA، ونتيجة لذلك يحدث اختلال في تنظيم المكونات التي تتحكم في الصفات الوراثية للخلية. كما تحدث أكسدة لبروتينات الأنزيمات الخاصة بتخليق البروتينات النووية المحتوية على DNA أو حدوث أكسدة لهذه البروتينات النووية ذاتها.

والأشعة السينية X-Rays مميتة للكائنات الدقيقة والأحياء الأرقى أيضاً (جدول 3)، وهي على عكس الأشعة فوق البنفسجية تمتلك طاقة عالية وذات مقدرة تخلليه كبيرة. وبرغم ذلك فإن استعمالها في أغراض التعقيم أو إبادة الميكروبات يعد أمراً غير عملي للأسباب التالية:

1. إن إنتاجها بالكميات الكبيرة اللازمة يعتبر من الأمور باهظة التكاليف.

2. إنه من الصعب استعمالها بالكفاءة اللازمة حيث أن إشعاعاتها تنتشر في جميع الاتجاهات المحيطة بمصدرها، إلاّ أنه يمكن استعمالها في إنتاج طفرات من الكائنات الدقيقة المختلفة لأغراض الدراسة. أما إشعاعات جاما Gamma Rays والتي يمكن الحصول عليها من إشعاعات النظائر المشعة Radioactive Isotopes مثل الكوبلت 60 فتشبه الأشعة السينية في تأثيرها المميت للكائنات الحية الدقيقة إلاّ أنها ذات موجات أقصر طولاً. ونظراً لقدرتها العالية على اختراق الأشياء Great Penetrating Power وكذا تأثيرها المميت للمكروبات Microbicidal Effect فإن استعمالها كثير الفائدة للتعقيم الداخلي للأشياء السميكة أو الكبيرة الحجم مثل الأطعمة المعلبة Packaged Foods وكذلك في تعقيم المضادات الحيوية Antibiotics، الفيتامينات Vitamins واللدائن Plastics مثل أطباق بتري Petri Dishes.

كما يمكن أيضاً استعمال الإشعاعات الإلكترونية Electron Beam Radiations والتي تعرف أيضاً بأشعة كاثود Cathode Rays في أغراض التعقيم لما لها من فعل مبيد للميكروبات Microbicidal Effect عندما تكون ذات كثافات مرتفعة جداً Very High Intensities (Millions of Volts) وتستعمل أجهزة تنتج مثل هذه الإشعاعات تعرف بالمعجلات Accelerators وتقوم على خلق جهد عال High Volts Potential بين الكاثود والأنود في أنبوبة مفرغة. وتستعمل هذه الأجهزة في تعقيم الأدوات الجراحية والأدوية والمواد الأخرى، وتتميز هذه الطريقة من التعقيم عن غيرها حيث يمكن تعقيم الأشياء المعبأة والمغلقة على درجة الغرفة. وبالرغم من أن الإلكترونات ذات قدرة ضعيفة على التغلغل في الأشياء إلاّ أنه يمكن إجراء التعقيم بها خلال فترات قصيرة جداً من التعريض.

جدول (3). متوسط الجرعة المميتة من الأشعة السينية X-Rays ضد الأنواع المختلفة من الكائنات.

Organism الكائن	Median Lethal dose (Rads) متوسط الجرعة المميتة
Virus: الفيروسات	
Tadacco mosaic	200.000
Rabbit papilloma	100.000
Bacteria: البكتريا	
Escherichia coli	5.000
Bacillus mesentericus	130.000
Algae الطحالب	
Mesotenium	8.500
Pandorina	4.000
Protozoa: الحيوانات الأولية	
Colpidium	330.000
Paramecium	300.000
Vertebrates الحيوانات الفقرية	
Goldfish: السمك الذهبي	750
Mouse: الفأر	450
Rabbit الأرنب	800
Rat: الجرذ	600
Monkey: القرد	450
Man (?): الإنسان	400

وفي نهاية موضوع التعقيم باختلاف طرقه وأساليبه ينبغي الإشارة هنا إلى أنه يجب إجراء اختبار التعقيم (العقامة) Sterility Test على جميع الأوساط أو

السوائل التي أجري تعقيمها بأي من الطرق السابق ذكرها وذلك بتحضّين الأوساط على درجة حرارة 30 مئوية لمدة 48 ساعة ثم التفحص للتأكد من التعقيم. أما السوائل المعقمة بالمرشحات فيسحب منها حوالي 1 مل تحت شروط التعقيم Aseptically ثم توضع في أطباق بتري معقمة ويصب عليها وسط مغذي Nutrient Medium وتحضن على درجة حرارة 30 مئوية لمدة 48 ساعة ثم تفحص الأطباق للتأكد من التعقيم.

وهناك أيضاً ضوابط أو علامات العقامة Sterility Checks التي تستخدم كثيراً في المصانع والمستشفيات والمناطق البحثية للتأكد من فاعلية التعقيم الحراري Heat Sterilizing Process وضمان القضاء على الجراثيم البكتيرية شديدة المقاومة للحرارة. وهذه الضوابط Checks إما أن تكون شرائط Strips من صبغات تتغير بالحرارة Thermolable Dyes إلى ألوان محددة، أو شرائط محملة بجراثيم بكتيرية شديدة المقاومة جداً للحرارة مثل **Bacillus Subtilis** أو **Bacillus Stearothermophiles** Spores.

أسئلة:

1. لماذا يعتبر التعقيم بالبخار تحت الضغط من أجود أنواع التعقيم؟
2. كيف يتم التعقيم في جهاز الأوتوكليف Autoclave؟
3. ما المقصود بالبسترة قصيرة المدة عالية الحرارة؟
4. ما هي ميكانيكية فعل الفينول والإيثانول؟
5. لماذا يعتبر أكسيد الإثيلين Ethylene Oxide من المعقمات الكيماوية الغازية؟
6. ما هي ميكانيكية التعقيم باستعمال المرشحات؟
7. أين تؤثر الإشعاعات في الخلية البكتيرية؟
8. كيف تتأكد عملياً من فعالية التعقيم؟

تركيب واستعمال المجهر الضوئي
Light Microscope

إن وظيفة المجهر هي تكبير الأشياء الدقيقة التي لا يمكن رؤيتها Invisible بالعين المجردة وجعلها مرئية Visible، وهذا يتطلب استعمال مجموعة عدسات Lenses بغرض التكبير Magnification. هذا التكبير يمكن أن يبلغ مئات أو مئات الآلاف من المرات وذلك على حسب نوع المجهر وطريقة الفحص المجهري Microscopy، وكذلك طريقة تجهيز العينات المراد فحصها مجهرياً.

هناك نوعان رئيسيان من المجاهر (على حسب الأساس الذي تبنى عليه عملية التكبير):

1. المجاهر الضوئية Light (optical) Microscopes
2. المجاهر الإلكترونية Electron Microscopes

يوجد ست طرق للمجهرَية الضوئية Light Microscopy يتم التكبير فيها باستعمال العدسات البصرية Optical Lenses وهي المجاهر الضوئية الآتية:

1. مجهر الحقل المضيء Light (Bright - Field) Microscope
2. المجهر اللصفي Fluorescence Microscope
3. مجهر الحقل المظلم (القاتم) Dark - Field Microscope
4. مجهر الأطوار المتباينة Phase contrast Microscope
5. مجهر الضوء المتداخل Interference Microscope
6. مجهر الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet Microscope

كذلك توجد طريقتان للمجهرية الإلكترونية يتم تكبير الصورة image فيهما بواسطة حزمة من الإلكترونات Beam of Electrons بدلاً من الموجات الضوئية Light Waves. وهذه المجاهر الإلكترونية هي:

1. The Transmission Electron Microscope (TEM)

2. The Scanning Electron Microscope (SEM)

المجاهر الضوئية هي الأكثر شيوعاً واستعمالاً وخاصة في الدراسات المبدئية المختلفة. أما المجاهر الإلكترونية فإن التكبير بها أكبر بكثير من المجاهر الضوئية وتستعمل لأغراض خاصة أو في الدراسات البحثية لرؤية التركيبات الداخلية للخلايا Subcellular Structures التي لا يمكن رؤيتها بالمجاهر الضوئية.

مجهر الحقل المضيء Light (Bright - Field) Microscope

في بداية اكتشاف المجهر كأداة للتكبير صنع مجهر بسيط Simple Microscope والمقصود بالبسيط هنا أن الجهاز يحتوي على عدسة واحدة محدبة التكبير وذات بعد بؤري صغير أي أن قوتها كبيرة وحيث كان يوضع الجسم المراد فحصه على بعد أقل من البعد البؤري للعدسة، وتكون العدسة ملاصقة للعين لذلك تتكون صورة تقديرية معتدلة مكبرة. ومع صقل العدسات ظهرت هواية تجميع المجاهر في أوروبا في القرن السابع عشر والقرن الثامن عشر. وكان الباحث الهولندي أنتوني فان ليوينهوك Antony Van Leeuwenhoek أول من أعلن رسومات في عام 1676 لكائنات حية دقيقة ومن ضمنها البكتيريا في عينة من الماء باستعمال المجهر البسيط. وبعد ذلك ظهر المجهر المركب Compound Microscope حيث تستخدم فيه مجموعتان أو أكثر من العدسات المحدبة وبذلك تزداد القوة التكبيرية والتي تحسب على أساس المعادلة التالية: التكبير الكلي = تكبير المجموعة الشيئية × تكبير المجموعة العينية.

وفي طريقة الفحص بالحقل أو المجال المضيء Bright - Field يظهر الحقل المجهري أو بمعنى آخر المنطقة التي ترى أو تشاهد عند النظر خلال العدسة العينية (Eye piece (Ocular Lens زاهية الإضاءة في حين أن الأشياء المراد مشاهدتها مكبرة تظهر معتمة أو قاتمة Dark.

تركيب مجهر الحقل المضيء:

يعتبر مجهر الحقل المضيء مجهراً ضوئياً مركباً Compound Light Microscope (شكل 6) ويستعمله خاصة علماء ودارسي علوم الأحياء الدقيقة لأنه أهم أداة في دراسة الأحياء الدقيقة وخاصة البكتيريا. فهم تركيب واستعمال هذا المجهر يقود الطالب إلى فهم علوم الميكروبات وزيادة الرغبة والتفوق في دراستها.

يتركب هذا المجهر من الآتي:

1. أنبوبة معدنية Metal Tube: وتتكون من جزءين هما أنبوبة جسم المجهر Body Tube وأنبوبة السحب Draw Tube، ويمكن سحب الأنبوبة الداخلية فينتج عن ذلك تباعد العدسة العينية عن الشيئية فيتسع الحقل المجهري. عادة يركب في أعلاها العدسة العينية Ocular Lens والتي قد تكون زوجية Binocular Tube (شكل 6) أو فردية Monocular Tube (شكل 7)، وفي أسفلها توجد القطعة الأنفية Nose Piece وهذه تتحرك دائرياً أي أنها Revolving وبها عادة 3 ـ 4 فتحات تركب بها العدسات الشيئية Objective Lenses.

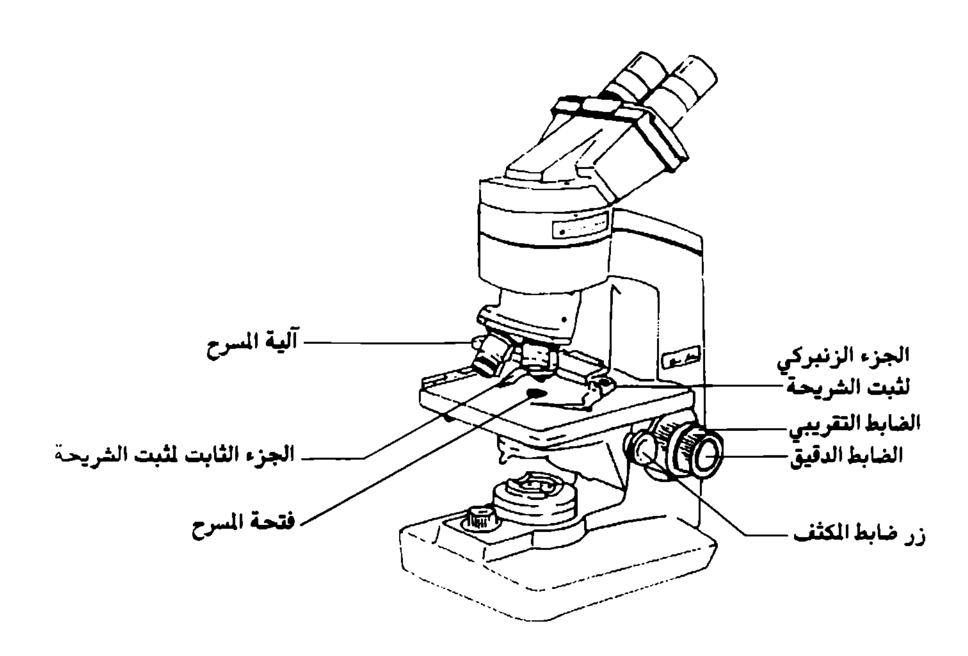
2. المسرح Platform or Stage: توضع عليه الأشياء التي يراد فحصها وفي حالة البكتيريا توضع على المسرح الشريحة الزجاجية Glass Slide التي تحتوي على التحضير الميكروبي. وقد يكون المسرح دائرياً أو مربعاً وعليه مقابض Clips لتثبيت الشرائح. في بعض المجاهر قد يكون المسرح آلياً Mechanical Stage وذلك لتحريك الشريحة بواسطة محركات زنبركية.

3. الهيكل Framework أو Stand ويشمل عادة الأجزاء التالية:

أ) القدم Foot أو القاعدة Base وشكلها قد يكون هلالياً على شكل حدوة الحصان Horse Shoe Shaped.

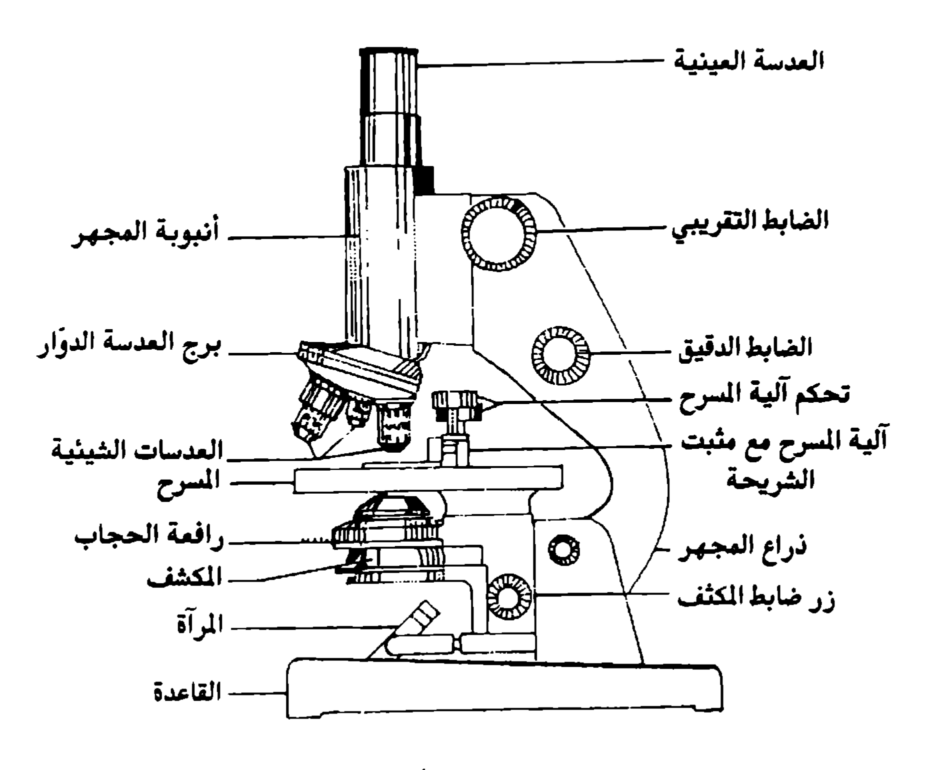
ب) المفصل Inclination Joint ويستعمل لإمالة المجهر إلى الأمام Foreward أو إلى الخلف Backward.

ج) الذراع Arm: وهو الجزء الذي يحمل أنبوبة المجهر والمسرح كما أنه يستعمل في حمل المجهر من مكان إلى آخر.



شكل (6). مجهر ضوئي ثنائي العينين.

Ao Spencer series 50 binocular Microscope



شكل (7). مجهر ضوئي أُحادي العين.

Monocular microscope (Graf-Apsco or Bausch and Lomb type)

4. مجموعتان من العدسات Two Sets of Lenses وهي:

أ) العدسة العينية Ocular or Eyepiece Lens: وهي مثبتة في أعلى أنبوبة المجهر وعادة تتركب من عدستين لكل منهما وجه محدب وآخر مسطح وهما مثبتتان في طرفي أسطوانة معدنية، العلوية منهما تسمى عدسة العين Eyepiece والسفلية تسمى العدسة المجمعة Collective Lens ووظيفتها تكبير المرئي الناتج من العدسة الشيئية. ويوجد من العدسات العينية عادة نوعان لكل منهما تكبير خاص (× 10، × 15).

وهناك عدسات عينية ميكرومترية Micrometric Eyepiece وتستعمل في

القياسات البكتيرية (مثل تعيين طول أو قطر خلية بكتيرية) فتستبدل العدسة العينية بأخرى ميكرومترية.

ب) العدسات الشيئية Objective Lenses: وهي عادة تثبت بالقطعة الأنفية ويوجد منها غالباً ثلاث عدسات هي: العدسة الصغرى Low Power Lens وتكبيرها × 10، العدسة الكبرى High Power Lens وتكبيرها × 40، والعدسة الزيتية المنغمسة Oil immersion Lens وتكبيرها × 100. وتستعمل الشيئية الصغرى والكبرى جافة Dry Lenses أما الزيتية المنغمسة فيجب لعملها وضع قطرة من زيت السيدار Cedarwood Oil على الشريحة المحتوية على التحضير الميكروبي لتنغمس فيها العدسة وفائدة هذا الزيت هو تجميع الأشعة.

5. الضوابط Adjustements: وهي عبارة عن جهاز ميكانيكي Mechanical Device لتعديل المسافة بين الشيء المرئي وبين العدسة الشيئية. يوجد عادة بهيكل المجهر، ومركب على الذراع بجوار أنبوبة المجهر ضابطان:

- الضابط التقريبي Coarst Adjustment.
- الضابط الدقيق Fine Adjustment.

6. المكثف Condenser: وهو جهاز مثبت عادة بأسفل المسرح وتحت الفتحة الموجودة بوسطه (ذلك لتجميع الضوء المنعكس من المرآة وتوجيهه لفتحة المسرح). يتركب المكثف من عدستين وحجاب Iris Diaphragm مركب من صفائح رقيقة من الصلب غالباً، هلالية الشكل يفتح ويقفل عند الحاجة باستعمال محرك، ووظيفته التحكم في الأشعة الضوئية التي تعكس من المرآة إلى المكثف. ويمكن تحريك المكثف عادة إلى أعلى وإلى أسفل وذلك بواسطة محرك أو ضابط خاص، والغرض من ذلك هو تنظيم التحكم في كمية الضوء التي تنفذ إلى الشيء المرئي، وقيمة الفتحة العددية Numerical

Aperture (N.A) للمكثف تتراوح عادة بين 1.20 ـ 1.25 ومعظم المجاهر الحديثة مزودة بجهاز إضاءة سفلي ولا تحتاج إلى مرآة.

7. المرآة MIRROR: وهي مرآة مسطحة من أحد الأوجه ومقعرة من الوجه الآخر وذلك لتوجيه أشعة المصباح أو الضوء العادي إلى الشيء المرئي خلال المكثف، ويستعمل كمصدر للإضاءة في الفحص العادي الضوء الطبيعي، ويفضل استعمال الضوء الصناعي في فحص البكتيريا وتستعمل عادة المرآة المقعرة إذا كان مصدر الضوء ضعيفاً أو عند استعمال العدسة الشيئية الكبرى (× 40) في الفحص.

العناية بمجهر الحقل المضيء: Light (Bright - Field) Microscope

القواعد الآتية تساعدك في الاحتفاظ بمجهرك في حالة عمل جيدة خلال فترة دراستك:

1. إحفظ مجهرك في مكان وضع الغطاء عليه لكي تحميه من الغبار ورطوبة الجو.
2. إحمل المجهر بيد وضع اليد الأخرى تحت القاعدة لتحميه من السقوط ويجب أن يكون مستقيماً وغير مائل حتى لا تسقط العدسة العينية وتنكسر.
3. من أجل عدم التسبب بتخشينات للعدسات، يجب عليك تنظيف العدسات فقط بورق العدسات Lens Paper. لا تستعمل أصابعك، أو مناديل ورقية أو أي شيء آخر لتنظيف العدسات؛ هذه الأشياء تعتبر كاشطة جداً Too Abrasive وتسبب ضرراً للعدسات. نظف فقط السطح الخارجي للعدسات، ولا تحاول إبعاد العدسات العينية أو الشيئية من المجهر. إذا لاحظت أن السطح الداخلي للعدسة غير نظيف أخبر المدرس Instructor بذلك.
4. المسرح، المكثف وأجزاء أخرى للمجهر يمكن تنظيفها بأنسجة خاصة

Facial Tissue أو قطع من الخرق الخاص Soft Lint - Free Rags.

5. بعد الاستعمال المكثف للمجهر Extensive Use of Microscope، زيت جاف وأوساخ أخرى يمكن أن تتجمع على العدسات وتقلل من قدرتها. في هذه الحالة تنظيف العدسات بواسطة قليل من Xylene أو محلول خاص لتنظيف العدسات وذلك باستعمالها فوق ورق العدسات. هذه المحاليل تحلل الزيت وتبعد الأوساخ. لا تستعمل محاليل أخرى مثل الكحول Alcohol أو الأستون Acetone إلاً في حالة ذكرها من الجهة المصنعة للعدسات. المواد الملصقة The Cements التي تستعمل لتثبيت العدسات في مكانها حساسة لهذه المحاليل.

6. قبل تخزين أي مجهر قم دائماً بتنظيفه جيداً. نظف خاصة كل الزيوت من العدسة الزيتية. الزيت مع الغبار يمكن أن يسبب تختيشات للعدسة ويقلل من قوة التمييز (قوة التحليل) Resolving Power للعدسة. الشريحة المتروكة على مسرح المجهر علامة مميزة للإهمال.

7. قبل تخزين أي مجهر، ضع المسرح في وضع مركزي، إرفع المساحة بين المسرح والعدسات الشيئية، ضع العدسة الصغرى (× 10) في مكانها، أخفض المكثف، مصدر تحكم الإضاءة واطفىء مصدر الضوء للمجهر.

تمرين (3): استعمال مجهر الحقل المضيء Use of the Light - Field Microscope الآن وبعد تعرفك على طرق العناية بالمجهر باستطاعتك استعماله.

الأدوات والمواد: Equipments and Material:

- حضر شرائح من الميكروبات التالية: بكتيريا، طحالب، حيوانات أولية، فطريات وحيوانات مجهرية أخرى.
- مجهر ضوئي Light Microscope

- ورق عدسات Lens Paper

- زيت غطس Immersion Oil

الطريقة : Procedure :

1. ضع مجهرك على مكان ثابت بعيداً عن حوض الماء واللهب.

2. إفحص المجهر إذا ما كان محفوظاً بطريقة جيدة (أنظر التعليمات الخاصة بحفظ المجهر) وإذا كان المجهر غير نظيف بعد استعماله المرة الأخيرة فأخبر مدرسك بذلك.

3. قارن الشكل (6) بمجهرك لتتعرف على الأجزاء المختلفة للمجهر.

4. ضع شريحة محضرة لأحد أنواع الميكروبات ويفضل من الكائنات الحية الدقيقة كبيرة الحجم مثل الفطريات، الحيوانات الأولية أو الطحالب على المسرح وثبتها عن طريق مثبت الشريحة Slide Holder. وجه الشريحة فوق الفتحة الضوئية Light Hole الموجودة في المسرح بحيث أن الضوء القادم من خلال المسرح من أسفل يضرب أو ينفذ من خلال الشريحة. مثبت الشريحة يحرك عن طريق ضوابط الشريحة Slide Adjustment Knobs المتصلة بالمسرح وتحته مباشرة.

5. ضع مأخذ (Plug) المجهر وافتح مفتاح الكهرباء.

6. ضع كابح قوة الضوء Light intensity Control في معدل المتوسط العلوي Upper - Middle Range.

قوة الضوء تضبط عن طريق Rheostat (Sliding Control or Rotating Knob) عند قاعدة المجهر. القوة من 6 إلى 7 في معدل المتوسط العلوي مناسبة لأغلب الدراسات الميكروبية. قوة ضوئية أعلى من هذا (9 - 10) تقصر من عمر المصباح الكهربائي Light's bulb ويجب تجنبها إذا أمكن ذلك. الحقل الضوئي يجب أن يكون أبيضاً وبدون تظليلات في مجال الصورة.

7. إضبط المكثف بواسطة منظم ارتفاع المكثف بحيث يكون المكثف تحت الشريحة.

التركيب الموجود تحت المسرح يسمى المكثف Condenser ويستعمل لجعل بؤرة الضوء Focus Light على الشيء. المكثف يجب أن يضبط بدقة لكل عينة يراد دراستها. إذا لم يضبط المكثف جيداً ربما لن تستطيع إيجاد الشيء المراد رؤيته أو في بعض الأحيان لن تستطيع رؤية تفاصيل العينة.

8. إفتح حجاب (غشاء) المكثف Condenser Diaphragm بحيث يكون الحقل (Field) مضاء بالكامل.

عند دراسة عينات غير مصبوغة مسبقاً يجب أن يكون حجاب المكثف تقريباً مقفولاً بالكامل، ولكن عند دراسة عينات مصبوغة يجب أن يكون الحجاب مفتوحاً بالكامل. حجم شعاع الضوء خلال المكثف والزاوية التي عندها يقابل الشيء منظم عن طريق رافعة الحجاب Iris Diaphragm Lever التي تفتح وتقفل حجاب المكثف. يجب عليك باستمرار ترك الحجاب مفتوحاً بعض الشيء لكي ترى صورة للشيء ولكن كمية الضوء التي تسمح لها بدخول المكثف تعني الفرق بين رؤية الشيء من عدمه. غالباً وعندما يكون الحجاب مفتوح كلياً فإن كمية كبيرة من الضوء تضرب الشيء وفي هذه الحالة ينتج قليل من التغاير Contrast بين الصورة وخلفية الصورة، وعندما يحدث هذا ربما لن تستطيع رؤية العينة. عند قفل الحجاب بعض الشيء فإن التغاير بين الشيء والخلفية يزيد بعض الشيء. من المستحسن أن تبدأ والحجاب مقفول تقريباً وبعد ذلك إضبط الفتحة للحصول على أحسن تغاير.

9. أدر برج العدسة Lens turret (Nosepiece) بحيث تأخذ القوة الصغرى الشيئية (× 10) مكانها.

العدسات الشيئية (× 10، × 40) تستخدم عامة لرؤية الكائنات الدقيقة ذات الحجم الكبير، كذلك قطاعات الأنسجة المختلفة (Tissue Sections)،

بينما العدسة الزيتية Oil immersion Objective × 100 تستعمل لرؤية الكائنات الدقيقة صغيرة الحجم مثل الخمائر والبكتيريا، كذلك التركيبات الداخلية للكائنات الدقيقة ذات الحجم الكبير Large Microorganisms.

10. إضبط المسافة بين العدسة × 10 والشريحة باستعمال الضابط التقريبي Coarse Focus Adjustment بحيث تكون العدسة حوالي 1/2 سم فوق العينة Specimen. دائماً عدل العدسة عن طريق ملاحظتها من الجنب.

كل عدسة شيئية يجب أن تعدل بمسافة من العينة تختلف عن الأخرى حتى يتم وضع الصورة في البؤرة. العدسة الشيئية × 10 تعدل بحوالي 1/2 سم من العينة (جدول 4). العدسة الشيئية × 10 يجب أن لا تلمس الزيت، الماء أو العينة.

11. قبل النظر خلال المجهر تأكد من وجود مسافة كافية بين الشريحة والعدسة.

12. أنظر خلال العدسة العينية Ocular lens وعدل الصورة باستعمال زر الضابط التقريبي The Coarse Focus Knob وذلك بزيادة المسافة بين العينة والعدسة الشيئية. إستعمل زر الضابط الدقيق لتوضيح الصورة.

جدول (4). خواص العدسات الشيئية

العدسة الشيئية Objective lens	التكبير Magnification	الطول (البعد) البؤري Focal Length (mm) مم	المسافة الفعالة Working distance (mm) مم	الفتحة العددية Numerical Aperature	التحليل Resolution ميكرون (µ m)
الصغرى Low Power	× 10	16	5.4	0.25	1.30
الكبرى High Dry	× 40	4.3	0.39	0.65	0.52
الزيتية المنغمسة Oil Immersion	× 100	1.8	0.12	1.30	0.26

13. إضبط فتحة حجاب المكثف لتحسين التغاير Contrast بين الكائن الدقيق Microorganism في العينة والخلفية Background.

14. إفحص بدقة Scan المجال وذلك بتحريك الشريحة وارسم ما ترى.

15. في حالة استعمال العدسة الجافة الكبرى (× 40)، أدر هذه العدسة حتى تقفل في مكانها. من الأحسن التركيز على جزء معين من صورة العينة باستعمال القوة الأدنى (× 10) قبل التغيير إلى العدسة الجافة الكبرى (× 40) أو العدسة الزيتية، حيث أن عدسات أغلب المجاهر مقيمة بحيث يكون هناك توافق Parfocal فإن العينة تكون غالباً معدلة (في البؤرة) In Focus. العينة التي تكون في البؤرة تحت عدسة شيئية معينة تكون أيضاً في البؤرة تحت العدسات الشيئية الأخرى. للحصول على صورة واضحة يتم ببطء تدوير زر الضابط الدقيق The Fine Adjustment Knob في اتجاه عقارب الساعة Clockwise أو في عكس اتجاه عقارب الساعة Counterclockwise، وذلك فقط جزء صغير من دورة واحدة. مسافة العمل للعدسة الشيئية × 40 تكون أقل من 1/2 ملليمتر (1/2 mm) من العينة. العدسة الشيئية × 40 يجب بتاتاً ألا تلمس الزيت أو الماء أو العينة.

16. إضبط فتحة حجاب المكثف لزيادة التباين أو التغاير بين الكائن الدقيق في العينة والخلفية.

17. إفحص المجال بدقة وارسم ما ترى.

18. عند استعمال العدسة الشيئية الزيتية المنغمسة (× 100) Oil Immersion Lens أدر العدسة الجافة العليا (× 40) أو الأدنى (× 10) من المكان وضع قطرة صغيرة من زيت الانغماس Immersion Oil على الشريحة. وبالتحديد فقط على المنطقة التي ترغب بدراستها، بعد ذلك أدر العدسة الزيتية المنغمسة في المكان. توضيح الصورة Fine Focusing مطلوب عادة.

قبل استعمال العدسة الزيتية المنغمسة (× 100)، ضع Position صورة العينة في مركز الحقل للعدسة الجافة (× 40). نظف العدسة × 100 بورق العدسات Lens Paper. من الأفضل تنظيف العدسة في كل مرة تنظر إلى شريحة جديدة. المسافة الفعّالة Working Distance للعدسة × 100 تكون تقريباً 0.1 مم (جدول 4). العدسة × 100 يجب دائماً أن تكون مغمورة في الزيت ولكن يجب أن لا تلمس العينة على الشريحة. عندما تستعمل العدسة الزيتية المنغمسة يجب عليك تعديل المكثف الواقع تحت الشريحة وذلك عن طريق استعمال ضابط ارتفاع المكثف The Condenser Height Adjustment على دعامة المسرح Stage Support. عندما يلمس المكثف خلف الشريحة Bottom of Slide، كل الضوء يوجه على منطقة صغيرة في الشيء (العينة) Object بحيث أغلب الضوء القادم من العينة Object يدخل إلى العدسة × 100 الصغيرة جداً. إذا لم ترفع المكثف، فإن الضوء سوف يتوزع على منطقة أكبر في العينة ولهذا ضوء قليل من العينة يدخل إلى العدسة الزيتية. النتيجة تكون صورة معتمة Dim Image ويترتب عليه نقص في قدرتك على رؤية التفاصيل في الصورة. أنظر خلال المجهر إذا كانت الصورة غير المعدلة للعينة مرئية أم لا. إذا كانت كذلك، حرك الضابط الدقيق The Fine Focus Adjustment ببطء بحيث يتكون عندك صورةَ واضحة (حادة) Sharp image. إذا لم تظهر لك صورة عندما تغير إلى العدسة الزيتية المنغمسة، حرك المسرح إلى أعلى ببطء باستعمال زر الضابط الدقيق The Fine Focus Adjustment Knob حتى تصبح العدسة الشيئية × 100 أقرب إلى العينة. تجنب اصطدام الشريحة مع العدسة وذلك بمراقبة هذه العملية من الجنب. العدسة يجب أن تكون بالكامل في الزيت ولكن يجب أن لا تلمس الشريحة أو غطاء الشريحة Coverslip. أيضاً تأكد من اتجاه دوران الضابط الدقيق بحيث يبتعد المسرح من العدسة عندما تبدأ في وضع الصورة في البؤرة Focusing. عندما تبدأ في النظر خلال العدسة العينية Eyepiece Lens أبعد الضابط الدقيق The Fine Focus

Adjustment ببطء بحيث يبتعد المسرح عن العدسة. خلال دورة واحدة تقريباً للضابط الدقيق تستطيع توضيح Focus العينة المراد دراستها. العدسة تكون في هذه الحالة ما زالت في الزيت. إذا لم يحدث هذا فإنك تكون قد ابتعدت كثيراً.

19. إفحص بدقة المجال وارسم ما ترى.

20. أدرس شرائح للبكتيريا، الطحالب، الحيوانات الأولية، والفطريات مستعملاً عدسات شيئية مختلفة وارسم ما ترى.

يوجد أسباب كثيرة لعدم قدرتك على رؤية أي شيء تحت العدسة الزيتية وحسب نسبة التكرار فإن هذه الأسباب هي:

(1) كمية كبيرة من الزيت على الشريحة

(2) تحريك الضابط الدقيق بسرعة.

(3) المكثف لم يضبط بدقة (عادة ما يكون الحجاب Iris مفتوحاً أو مقفولاً كثيراً).

(4) عدسات غير نظيفة.

(5) عدد الميكروبات قليل جداً على الشريحة.

(6) صورة العينة لم يتم تركيزها قبل التغيير إلى العدسة الزيتية.

(7) الشريحة مقلوبة (العينة مصبوغة على الشريحة ولكن قلبت الشريحة عند وضعها تحت عدسة × 10 أول مرة).

تمرين (4): إستعمال العدسة الزيتية المنغمسة مباشرة:

Using the Oil immersion Lens Directly

عند دراسة البكتيريا من الأفضل استعمال العدسة الزيتية المنغمسة وترك الملاحظات الأولية باستعمال العدسات الأقل قوة (× 40، × 10)، مع أن بعض المدرسين INSTRUCTORS يفضل استعمال العدسة الزيتية المنغمسة

مباشرة فقط للطلبة ذوي الخبرة الكافية. الطريقة التالية يجب أن تتبع عند استعمال العدسة الزيتية المنغمسة مباشرة:

1. يجب تنظيف العدسة الزيتية المنغمسة في كل مرة عند دراسة شريحة جديدة.
2. ضع العينة الموجودة على الشريحة في مركز فتحة الضوء حيث تكون العدسة الزيتية المنغمسة عمودياً على العينة.
3. ضع قطرة صغيرة من زيت الانغماس على العينة.
4. تأكد من وجود مسافة كافية بين الزيت والعدسة الزيتية (× 100) قبل أن تدير العدسة فوق العينة.
5. عدل Adjust المكثف Condenser بحيث يكون مباشرة تحت الشريحة. أقفل حجاب المكثف Condenser Diaphragm كلياً عندما تريد رؤية عينات حية Living Organisms بالطريقة المبتلة Wet Mount، وافتح حجاب المكثف عند دراسة عينات مصبوغة.
6. باستعمال الضابط التقريبي Coarse Focus Adjustment قلل المسافة بين العدسة الزيتية المنغمسة والعينة حتى تنغمس العدسة في الزيت وتقريباً تلمس العينة.

ملاحظة: المسافة الفعالة Working distance لعدسة التكبير × 100 تبلغ حوالي 0.1 مم (0.1 mm) ولهذا يجب تجنب دك الشريحة في العدسة وذلك بمشاهدة تقارب الاثنان من الجانب ودائماً ملاحظة أن المسافة بين المسرح Stage والعدسة Lens في ازدياد.

7. الآن أنظر خلال المجهر وابحث عن صورة العينة عن طريق زيادة المسافة بين المسرح والعدسة. تأكد من معرفة أي اتجاه أنت تدير زر الضابط الدقيق Fine Focus Adjustment Knob لزيادة المسافة بين المسرح والعدسة.

8. عن طريق دورة واحدة فقط يمكن رؤية الصورة، حرك الشريحة قليلاً إلى الأمام وإلى الخلف أثناء البحث Focusing يساعدك في إيجاد الصورة بسرعة.

ملاحظة: إذا لم تجد الصورة خلال ثلاث إلى خمس دورات أو عندما تكون العدسة خارج الزيت فهذا يعني أنك خرجت من مجال إيجاد الصورة بسهولة. في هذه الحالة كرر خطوات (6) و (7).

أسئلة:

(1) فرق بين المجهر الضوئي والمجهر الإلكتروني.

(2) أذكر الأجزاء التي يتركب منها المجهر الضوئي ووظيفة كل جزء.

(3) ما هي أسباب عدم رؤية الأشياء واضحة تحت العدسة الزيتية؟

تمرين (5): تنظيف الشرائح المجهرية: Cleaning Microscope Slides

يوجد طريقتان رئيسيتان لتحضير العينات الميكروبية للمشاهدة تحت المجهر الضوئي.

1. الطريقة المبتلة Wet Mount (الباب الثالث).
2. طريقة اللطخات المصبوغة Stained Smears.

في كلا الحالتين تحضر العينات على شرائح مجهرية. ونظراً لأن الخلايا البكتيرية صغيرة جداً هناك عدة مشاكل تعوق رؤية العينات ومن أهمها مشكلتان يجب تجنبهما:

1. عندما تكون الشرائح مخدوشة Scratched Slides أو غير نظيفة Dirty Slides فإن هذه الخدوش وكذلك الغبار تظهر تحت المجهر شبيهة إلى حد ما بالخلايا البكترية وبذلك الاعتقاد خطأ بأنها ميكروبات.

2. عند العمل بشريحة غير نظيفة فإن اللطخة Smear لا يتم توزيعها جيداً فوق الشريحة.

المواد: Materials

- شرائح مجهرية (عدد 6) × Microscope Slides
- الكحول في قنينة ضغط 95% alcohol (isopropyl)
- مسحوق تنظيف Powdered Cleanser
- مناديل ورق Paper Towels

الطريقة: Procedure

1. بالقرب من حوض الماء تجد صحناً يحتوي على مسحوق تنظيف.
2. إضبط صنبور الماء بحيث يكون دافئاً وبلل إصبعيك السبابة والوسطى Forfinger and Middle Finger
3. أدلك Rub إصبعيك المبللان على مسحوق الصابون حتى تلتصق بهما كمية مناسبة من الصابون.
4. نظف الشريحة من الجانبين بواسطة الدلك أو الحك بمسحوق الصابون.
5. إغسل الصابون من على الشريحة بماء دافىء.
6. ربما تحتاج إلى تكرار الخطوات 4 ـ 5.
7. ضع عدة قطرات من الكحول على جانبي الشريحة باستعمال قنينة الضغط Squeese Bottle.
8. أبعد الكحول الزائد على سطح الشريحة وامسح الشريحة بمنديل ورق ناعم قبل جفاف الكحول.
9. الآن تملك شريحة نظيفة للاستعمال ودائماً أمسك الشريحة من الأطراف

حفاظاً عليها من التلوث من زيت جلد الأصابع Skin oils. كرر التمرين عدة مرات للحصول على شرائح نظيفة.

أسئلة:

1. ما هي الطريقتان الرئيسيتان لتحضير عينة للمشاهدة تحت المجهر؟
2. ما هي المشاكل التي تعوق رؤية العينة واضحة تحت المجهر؟

الباب الثاني

زراعة الكائنات الدقيقة

Culturing of Microorganisms

إثبات تواجد الكائنات الدقيقة في كل مكان

Ubiquity (Omnipresence) of Microorganisms

هذا التمرين يوضح لك بأن الميكروبات متواجدة في كل مكان Ubiquitous، كذلك يعلمك ضرورة استعمال تقنية خالية من الميكروبات Aseptic Technique عندما تشتغل في المعمل حتى لا تدخل في مزارعك النقية ميكروبات خارجية غير مرغوب فيها. الميكروبات متواجدة في كل مكان، في قاع المحيطات، في الهواء، في ماء الشرب، في التربة، داخل جسمك وعلى جلدك... إلخ.

ملاحظة هامة: في أغلب الأحيان تشتغل في المعمل بصحون بتري محتوية على أوساط مغذية Media مختلفة في التركيب الكيميائي ولكن متشابهة في اللون، لذلك لا تبعد أغطية الصحون قبل كتابة البيانات الخاصة لكل وسط على خلف Bottom الصحن كتابة البيانات على خلف الصحن يضمن لك معرفة نوع الوسط عند تبادل أغطية الصحون.

المواد: Materials

- أنبوبة تحتوي على 10 مل من الحساء المغذي Nutrient Broth.

ـ مواد لعمل Wet Mount (الباب الثالث).

ـ صحون بتري تحتوي على أجار مغذٍ (عدد 5).

ـ صحون بتري تحتوي على Trypticase Soy Agar (TSA).

ـ أنبوبة تحتوي على ممسحتين معقمتين Two Swabs مغطستين في 2 مل محلول ملحي معقم.

تمرين (6):

نمو الكائنات الدقيقة من عينة تربة Growing Microorganisms From Soil

الطريقة: Procedure

1. خذ أنبوبة تحتوي على حساء مغذ Nutrient Broth واكتب عليها (ميزها) بيانات التجربة.
2. أحضر بعض التربة الرطبة من خارج المعمل وضعها في الأنبوبة.
3. ضع الأنبوبة في 30 درجة مئوية لمدة 48 ساعة أو في درجة حرارة الغرفة لمدة أطول.
4. إعمل Wet Mount من مزرعة التربة واكتب تقريراً Lab Report عن الميكروبات التي تشاهدها تحت المجهر (أنظر الباب الثالث).

تمرين (7):

نمو الكائنات الدقيقة المنتشرة في الهواء Growing Microorganisms From the Air

الطريقة: Procedure

1. خذ صحن بتري يحتوي على أجار مغذ Nutrient Agar واكتب عليه إسم التجربة.
2. الخلايا الميكروبية صغيرة وخفيفة جداً ولذلك توجد بنسبة كبيرة في الهواء. لإثبات ذلك إفتح الصحن المحتوي على الأجار المغذي والمعقم

لمدة 20 دقيقة. هذا يجعل بكتيريا وفطريات الهواء تترسب على سطح الأجار المغذي في الصحن وتتطور إلى مستعمرات Colonies بعد وضعها في الحاضنة لمدة من الزمن.

3. ضع الصحن مقلوباً في الحاضنة في 30 درجة مئوية لمدة 48 ساعة.
4. إرسم مستعمرات البكتيريا والفطريات التي تشاهدها نامية في الصحن.

تمرين (8):

عزل الكائنات الدقيقة المتواجدة على سطح الطاولة

Growing Microorganisms on your Table Top

هذا التمرين يوضح لك بأن هناك الكثير من الميكروبات على سطح الطاولة التي تجري عليها تجاربك ولهذا يجب أن تطهر Disinfect مكان عملك فوق الطاولة قبل وبعد كل تمرين عملي في المعمل.

1. كالعادة أكتب البيانات اللازمة على خلف صحن بتري يحتوي على أجار مغذ.
2. خذ ممسحة قطنية Cotton swab مغطسة في محلول ملحي Saline وامسح بطرف الممسحة جزء أمن سطح الطاولة (يجب عمل هذا قبل تطهير الطاولة). إختر بعض الأماكن على سطح الطاولة حيث يتواجد غبار مثل زوايا الطاولة.
3. إمسح Streak سطح الصحن بهذه الممسحة الملوثة Contaminated swab وذلك باستغلال كل سطح الصحن.
4. أرجع غطاء الصحن وضع الصحن مقلوباً في الحاضنة في درجة 30 مئوية ولمدة 48 ساعة.
5. إرسم النموات الميكروبية (بكتيريا وفطريات) في كراسة الملاحظات المعملية.

6. ربما ترغب في تكرار هذا التمرين بعد تطهير الطاولة وسوف تلاحظ انخفاضاً كبيراً في عدد الميكروبات النامية على سطح الصحن.

تمرين (9):

عزل البكتيريا النامية على سطح جسمك Growing Bacteria on you

الطريقة: Procedure

1. خذ صحن بتري يحتوي على أجار مغذ وميزه بالبيانات اللازمة.
2. تستطيع أن تحصل على مزارع بكتيرية من أي مكان على سُطح جسمك ولإثبات هذا ضع أطراف أصابع إحدى يديك على سطح الأجار المغذي والمعقم في الصحن.
3. أقفل الصحن وضعه في الحاضنة في درجة 30 مئوية ولمدة 48 ساعة.
4. إغسل يديك جيداً بالماء والصابون (لا تجففهما) وضع إصبعك ثانية على سطح الأجار المغذي المعقم في صحن بتري آخر كما فعلت مع الصحن الأول.
5. إرسم المستعمرات النامية على كلا الصحنين ولاحظ الفرق في الكثافة البكتيرية في الصحنين.

تمرين (10):

الحصول على بكتيريا من داخل جسمك Growing Bacteria in you

الطريقة: Procedure

1. خذ صحن بتري يحتوي على TSA وميزه بالبيانات اللازمة. في هذه الحالة يفضل استعمال TSA بدل من الأجار المغذي نظراً لأن TSA يحتوي على مواد مغذية ذات قيمة غذائية كبيرة تحتاجها البكتيريا

المتواجدة داخل جسم الإنسان مثل Streptococci التي لا تنمو إلاّ في وجود عناصر غذائية معينة Fastidious Microorganisms .

2. كل فتحات الجسم Body Orifices تحتوي على أنواع مختلفة من الميكروبات؛ لهذا إلمس بلسانك السطح المعقم لصحن TSA .

3. أقفل الصحن وضعه في الحاضنة في 37 درجة مئوية لمدة 48 ساعة . الميكروبات في جسم الإنسان تفضل درجة حرارة 37 للنمو .

4. إرسم المستعمرات البكتيرية التي تنمو وتعتبر من ضمن بكتيريا الفم .

أسئلة :

1. كيف تثبت تواجد البكتيريا في الهواء؟ .
2. لماذا يجب تطهير مكان العمل في المختبر قبل وبعد إجراء التجارب؟
3. لماذا عند عزل بكتيريا من جسمك يفضل استعمال درجة حرارة 37 مئوية ووسط غني مثل TSA؟
4. لماذا تكتب البيانات الخاصة بالمزرعة دائماً خلف الصحن؟

عزل البكتيريا بطريقة التخطيط
STREAKING FOR ISOLATION

طلبة علوم الأحياء الدقيقة المبتدئون يجدون صعوبة في عزل المستعمرات البكتيرية للأسباب التالية:

1. لا يستغلون كل المساحة على الصحن مما ينتج عنه تخفيفات قليلة.

2. يستعملون تلقيحة Inoculum كبيرة مما يترتب عليه تراكم الخلايا mixed colonies على بعضها وبذلك يجب تخفيفها من جديد على صحن آخر حتى يتم الحصول على مستعمرات نقية Pure Colonies.

هذا التمرين يهدف إلى مساعدتك في حل هاتين المشكلتين وذلك عن طريق استغلال كل سطح الصحن، وكذلك بالتعود على نقل تلقيحة صغيرة جداً فوق إبرة التلقيح وتوزيعها Streaking على الصحن حتى تتحصل على مستعمرات منفصلة separated colonies.

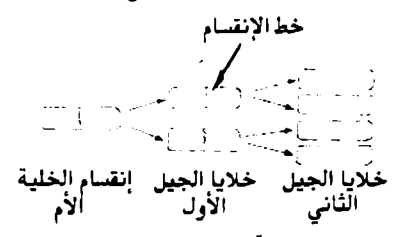
من الصعب الإدراك بأن الخلية البكتيرية صغيرة جداً وبأن حجم هذه الخلية يبلغ حوالي 250000/1 من الأنش، لهذا عندما تنقل بكتيريا بواسطة إبرة الزرع على سطح صحن يحتوي على أجار مغذ فإنك في الواقع تضع عشرات الآلاف من الخلايا على هذا الوسط، لهذا يعلمك هذا التمرين أهمية استعمال التلقيحة الصغيرة جداً أثناء عزل البكتيريا.

التخطيط الجيد Good streaking ينتج عنه مستعمرات نقية pure colonies. المستعمرات النقية تنتج من خلية أصلية واحدة single mother cell. كل خلية تنمو وتنقسم عن طريق الانقسام الثنائي البسيط Asexual

خلال 20 إلى 30 دقيقة وتعطي خليتين Binary Fission Two Daughter Cells. بعد 20 إلى 30 دقيقة أخرى الخليتان تنقسمان إلى أربع خلايا Four new Daughter Cells (شكل 8). وهكذا فإن الخلايا الجديدة تستمر في الانقسام في أعداد آسية Exponential Numbers مما ينتج عنه بلايين من الخلايا. هذه البلايين من الخلايا تتراكم على بعضها وبجوار بعضها وبذلك نقول عنها بأن مستعمرة نقية قد تكونت. تذكر دائماً بأن المستعمرة تعتبر نقية فقط عندما تكون ناتجة عن تكاثر خلية واحدة فقط وعندما لا تلمس هذه المستعمرة، مستعمرة أخرى.

في الواقع فإن مستعمرة أغلب أنواع البكتيريا وبعد 24 ساعة من التكاثر تحتوي على 50 إلى 72 جيل أو نسل من الخلايا الناتجة Daughter cells. النمو البكتيري Bacterial growth يعني إذاً زيادة في العدد Cell Numbers وليس زيادة في الحجم Cell Size.

عزل البكتيريا بطريقة التخطيط تعتبر تقنية أساسية ومهمة جداً من أجل نجاحك في معامل الأحياء الدقيقة. لذلك تعلم هذه الطريقة جيداً وقم بإجراء جميع التمارين الخاصة باستعمال هذه الطريقة.



شكل (8). التكاثر اللاّجنسي (Binary Fission) للخلايا البكتيرية.

تمرين (11):

تدريب أولي حول طريقة العزل بالتخطيط وباستعمال ورقة وقلم

Simulation of Streaking for Isolation Using Paper and Pencil

1. على ورقة إرسم دائرة قطرها 3 إنش ثم خطط واكتب الأرقام كما في

شكل (9). لاحظ بأن قسم (0) صغير مقارنة بباقي الأقسام والتي تكون متساوية في المساحة.

2. باستعمال قلم رصاص أو حبر (خطاط) تتبع هذه الخطوات حيث أنها بداية عزل البكتيريا الحية على صحن بتري يحتوي على أجار مغذ، يجب عليك أن تتذكر دائماً بأنك تخفف عدد الخلايا في كل قسم وبأنه يجب عليك دائماً تعريض إبرة التلقيح Inoculating Loop للهب بين كل قسم وآخر على الصحن، لأن تعريض إبرة التلقيح أو الزرع على اللهب يقتل الخلايا البكتيرية المتبقية على الإبرة وهذا يساعد في تخفيف عدد الخلايا، كل قسم يمثل تخفيفاً Dilution أو اختزالاً لآلاف الخلايا البكتيرية من الحقنة الأصلية original Inoculum قسم (0) يمثل الحقنة الأصلية حيث الآلاف من الخلايا.

3. خطوات هذه الطريقة يجب أن تكون متسلسلة. إبدأ الآن بالخطوة الأولى باستعمال القلم، خطط في القسم (0) كما، مبين في الشكل (10)، مع ملاحظة أن مساحة قسم (0) يجب أن تكون صغيرة.

4. إرسم خطوطاً من قسم (0) إلى قسم (1) كما هو مبين في الشكل (11) هذا يمثل التخفيف الأول مع ملاحظة استعمال أكبر مساحة من قسم (1) وكذلك عدم تقاطع الخطوط مع بعضها وعدم امتدادها إلى قسم آخر. فقط الخطان أو الثلاثة الأوائل تدخل قسم (0). هذه هي الخطوة التالية في التخطيط.

5. أدر Rotate الورقة في عكس اتجاه عقارب الساعة تقريباً 1/4 دورة حتى يكون قسم (1) على اليسار. إبدأ من جديد في تخفيف عدد الخلايا في قسم (2) كما هو مبين في شكل (12) أو الخطوة الثالثة.

6. إعمل الآن الخطوة الرابعة: أدر الورقة من جديد إلى اليسار وابدأ في التخفيف الثالث وذلك بتخطيط قسم (3) كما هو موضح في شكل (13).

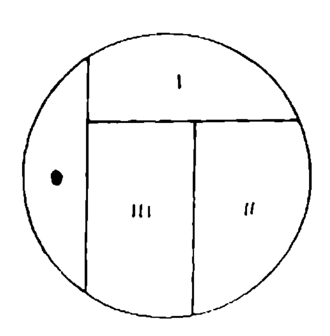
دائماً لاحظ بأن فقط خطين أو ثلاثة تدخل في القسم السابق والذي منه يبدأ التخطيط. عادة قسم (3) غير ضروري ولكن للطلبة المبتدئين الذين يستعملون كمية كبيرة من الحقنة الأصلية في قسم (0).

7. كرر هذا التمرين عدة مرات باستعمال ورقة وقلم حتى تستطيع إتقانه لما له من أهمية في عزل المزارع البكتيرية.

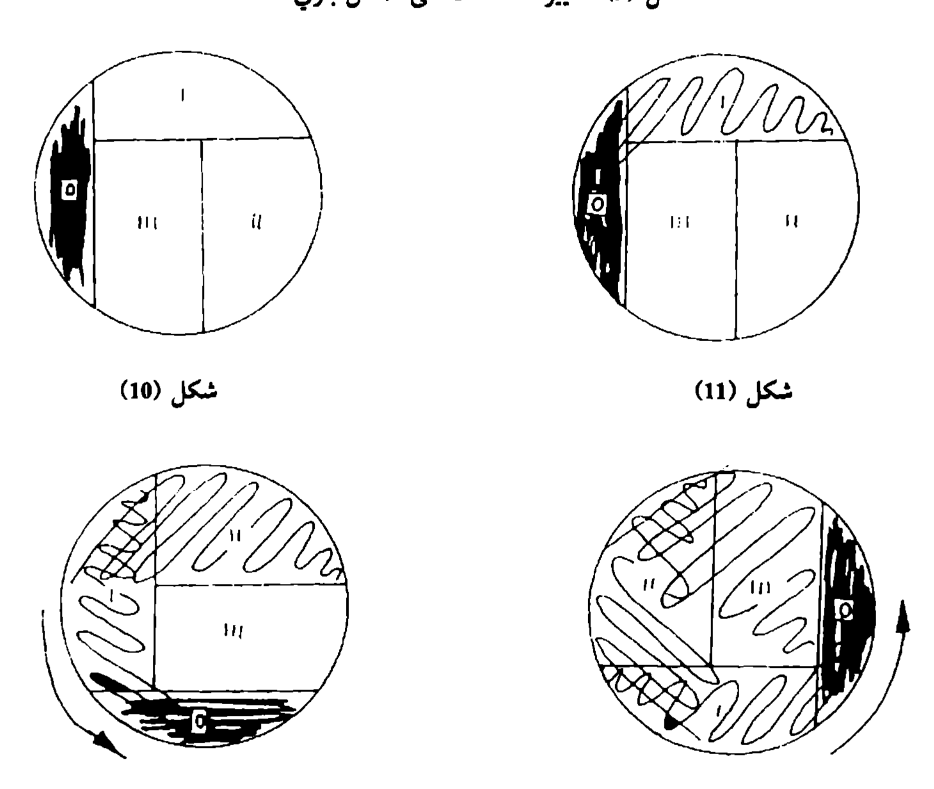
تمرين (12):

تدريب أولي آخر حول طريقة العزل بالتخطيط وذلك باستعمال صحن بتري فارغ وقلم خطاط Dry Run Using Empty Petri Dish and Felt Pen

1. إجمع صحن بتري فارغ، قلم خطاط وكذلك قلماً شمعياً لتخطيط الزجاج ـ Wax Glass marking Pencil.



شكل (9). تمييز القطاعات على صحن بتري.



شكل (10) **شكل (11)**

شكل (12) **شكل (13)**

الأشكال (10 ـ 13). تبين الخطوات المتبعة في عزل البكتيريا بطريقة التخطيط

2. إقلب صحن بتري وخط عليه بالقلم الشمعي كما في شكل (14). لاحظ الأوضاع المختلفة للأقسام مقارنة بأوضاعها في شكل (9)، كما لاحظ جيداً بأن وضع قسم (1) يكون معكوساً عندما يكون صحن بتري مقلوباً، هذا يعني أن قسم (1) الآن على خلف الصحن بدلاً من على السطح.
3. الآن أرجع الصحن إلى وضعه الأصلي بدون أن تفتحه. الخطوط Markings تظهر الآن كما في شكل (15) وأوضاع الأقسام الآن متطابقة مع شكل (9).
4. الآن وكما تعلمت كيف تعمل التخفيف بأربع خطوات (تمرين 11)، تخيل بأن القلم الخطاط Felt Pen هو عبارة عن إبرة الزرع Inoculating Loop وبأن صحن بتري الفارغ يحتوي على وسط مغذٍ صلب Solid Medium.
5. عند فتح الصحن عليك بحماية الوسط المغذي من الجراثيم الهوائية، لهذا يجب عليك فتح الصحن فقط بمقدار يسمح لك بتخطيط كل قسم وكأنك تستعمل إبرة الزرع، شكل (16) يوضح لك كيف ترفع الغطاء Lid بيدك اليسرى.
6. حيث أنه الآن يوجد صحن بتري أمامك على طاولة العمل، إرفع غطاء الصحن كما في شكل (16) واتبع الخطوات كما في تمرين (11) وذلك بالتخطيط على الأقسام الأربع باستعمال القلم والخطاط Felt Pen وأقفل الصحن بعد الانتهاء من التخطيط.

تمرين (13):

عزل البكتيريا الحية بطريقة التخطيط

Streaking For Isolation Using Living Bacteria

عندما تكون قد أتقنت التخطيطات الأولى على الورقة (تمرين 11) وعلى صحن بتري الفارغ (تمرين 12)، فباستطاعتك الآن أن تبدأ في العمل الحقيقي وهو عزل البكتيريا بطريقة التخطيط أو المسح Streaking for Isolation.

المواد: Materials

1 . مزرعة بكتيرية Bacterial Culture

2 . إبرة تلقيح Inoculating Loop

3 . صحن بتري يحتوي على أجار مغذي Nutrient Agar Plate

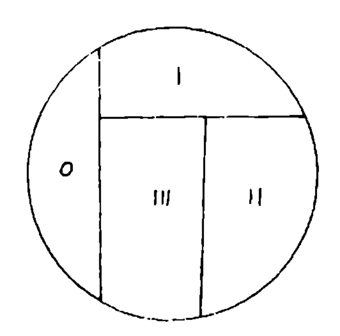
4 . لهب Flame.

الطريقة: Procedure

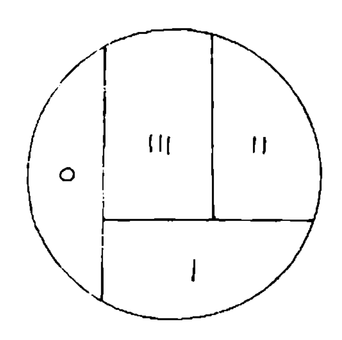
1 . قسم خلف صحن الأجار المغذي إلى أربع أجزاء كما تعلمت في تمرين (12)

2 . إتبع الخطوات كما في تمرين (12)

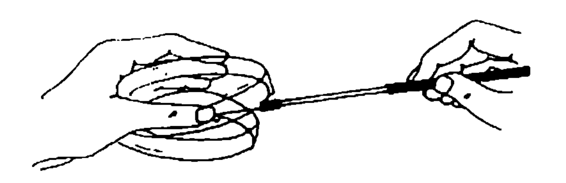
ملاحظة: من السهل قطع الأجار بإبرة التلقيح، لهذا استعمل لمسة خفيفة عند أخذ عينة البكتيريا من المزرعة. ولتسهيل هذا يجب أن تكون الإبرة في وضع مسطح Flat ما أمكن ذلك، كمية البكتيريا Inoculum المنقولة على الإبرة يجب أن تكون صغيرة ما أمكن وليس من الضروري أن تكون مرئية بالعين Macroscopically. كذلك يجب عليك تعريض الإبرة للهب وتركها تبرد بين كل تخفيف وآخر.



شكل (14). تمييز قطاعات التخفيف على خلف صحن بتري الفارغ.



شكل (15). تمييز قطاعات التخفيف على خلف صحن بتري كما تشاهد من على سطح صحن بتري الفارغ.



شكل (16). الإستعمال الصحيح لغطاء صحن بتري. إفتح صحن بتري قليلاً، ولكن أبقِ الغطاء على الصحن. هذا يحافظ على حماية الوسط المغذي المعقم Sterile Medium من التلوث بميكروبات الهواء.

3 . إحقن صحن الأجار المغذي في قسم (0) من مزرعة بكتيرية مثل **E. coli** محفوظة في أنبوبة الأجار المائل Nutrient Agar Slant Culture أو غيرها من المزارع البكتيرية واستمر في عمل التخفيفات كما هو موضح في التمرينين (11، 12).

4 . بعد الانتهاء من الزرع بطريقة التخطيط، إقلب الصحن واكتب البيانات اللازمة وضعه في الحاضنة في 30 درجة مئوية لمدة 48 ساعة.

فقط وبعد التحضين سوف تعرف ما إذا كان عملك ناجحاً وعزلت مستعمرات نقية، حيث يظهر الصحن شبيهاً بما في شكل (17)، المستعمرات المعزولة تظهر عادة قبل قسم (3) حيث أن المسح على هذا القسم غير ضروري إلاّ للطلبة المبتدئين. أترك مدرسك يطلع على الصحن للتصديق على نجاح عملك أو لمساعدتك.

ملاحظة هامة:

إذا ظهرت مستعمرات في مناطق لم تلمسها إبرة الحقن فإن هذه المستعمرات جاءت من الهواء ولوثت المزرعة Airborne Contaminants. هذه المستعمرات يجب أن لا تنتقل للتخطيط الثاني Subculturing للحصول على بكتيريا نقية، لهذا أدرس المستعمرات جيداً بعد التخطيط الأول First Streaking.

أسئلة:

1 . كيف تتحصل على مستعمرات بكتيرية منفردة أثناء عزل البكتيريا بطريقة التخطيط Streaking؟

2 . ما المقصود بالنمو البكتيري Bacterial growth؟

3 . كيف تتفادى قطع الأجار بإبرة التلقيح أثناء الزرع؟

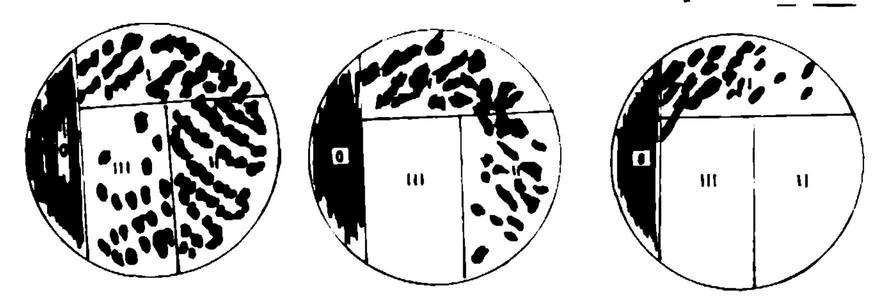
تمرين (14):

إستعمال ممسحة في الزرع

Use of a Cotton Swab for Original Inoculum

في المعامل الطبية Medical Laboratories العينة التي تستعمل لنمو وعزل البكتيريا عادة تجمع على ممسحة معقمة Sterile Swab. فمثلاً عند أخذ العينات من المرضى من داخل الرقبة Throat Culture تستعمل هذه الممسحات المعقمة. عند أخذ العينة الأصلية Original inoculum من الرقبة ووضعها على الوسط المغذي في الصحن فإن تخطيط أو مسح Streaking هذه العينة يتم بعد ذلك بنفس الطريقة تماماً كما جاء في تمرين (13).

من أجل إجراء هذا التمرين في المعمل يمكنك استعمال مزرعة سائلة مثل E. coli نامية في Nutrient Broth بدلاً من استعمال عينة المريض.



شكل (17). صحون بتري بعد التحضين لمدة 48 ساعة وهي تظهر مستعمرات بكتيرية معزولة Isolated colonies. بإستثناء قسم (0) بالإمكان عزل البكتيريا من الأقسام الأخرى.

المواد: Materials

- مزرعة سائلة لبكتيريا E. coli في أنبوبة اختبار.

ـ ممسحة معقمة Sterile Swab.

ـ صحن بتري يحتوي على أجار مغذٍ Nutrient Agar plate

الطريقة : Procedure

1 . إبدأ هذا التمرين بتقسيم صحن الأجار المغذي إلى أربعة أقسام كما جاء في تمرين (12).

2 . إمسك المزرعة السائلة E.coli Broth Culture والأنبوبة المحتوية على الممسحة المعقمة في يدك اليسرى، أبعد غطاء Capalls الأنبوبين مراعياً عدم التعرض للتلوث Aseptic Technique، وذلك بواسطة الإصبع الصغير والإصبع المجاور له.

3 . أخرج الممسحة المعقمة من الأنبوبة المعقمة بواسطة الإبهام Thumb والسبابة Forefinger ليدك اليمنى.

4 . عرض رقبة الأنابيب للهب، ثم غطّس الممسحة في المزرعة السائلة داخل الأنبوبة حتى تتشبع بمحلول البكتيريا. عرض مقدمة الأنابيب للهب من جديد وضع عليها الغطاء وضعها في حامل الأنابيب Test Tube Rack.

5 . أنت الآن ما زلت محتفظاً بالممسحة في يدك اليمنى، عليك الآن برفع غطاء الصحن وتخطيط أو مسح قسم (0) بالبكتيريا E.coli.

6 . أبعد الممسحة الآن في إناء يحتوي على مطهر Disinfectant أو إناء آخر مناسب وخطط أو امسح باستعمال إبرة الزرع Inoculating Loop بنفس الخطوات في التمارين السابقة (تمرين 12، 13) وذلك من أجل عزل مستعمرات نقية Pure Colonies.

7 . ضع صحن الآجار المغذي Streaked Agar Plate في الحاضنة عند 30 درجة مئوية لمدة 48 ساعة.

8 . ادرس المزرعة من حيث نجاحك في الحصول على مستعمرات نقية وارسم التخفيفات؟

أسئلة:

1 . أين تستعمل الممسحة Swab؟

2 . لماذا نضع الممسحة في مطهر بعد استعمالها في زرع العينات؟

المميزات المزرعية للبكتيريا
Cultural characteristics of Bacteria

بعض الميكروبات تمتلك نمطاً معيناً أثناء النمو distinctive growth pattern، فقط عندما يكون هذا النمو المميز محدود على هذا النوع من البكتيريا فإنه يساعدنا في التعريف بهذه البكتيريا identification of the species. كثيراً من البكتيريا تتشابه في نمط النمو. في هذا التمرين سوف يتعرف الطالب على بعض النموات البكتيرية الخاصة بأنواع معينة والتي تختلف عن النموات البكتيرية الأخرى. أدرس الأشكال (18) (19) قبل البدء في إجراء التمارين المعملية.

في هذا التمرين سوف ندرس نوعين من النموات البكتيرية:

1 . مستعمرة معزولة على سطح الأجار المغذي.

2 . مزرعة سائلة في حساء مغذٍ.

تمرين (15):

دراسة شكل المستعمرة Colony Morphology

في هذا التمرين سوف ندرس ثلاث صفات لمستعمرة بكتيرية معزولة

على سطح الأجار المغذي.

1 . شكل المستعمرة.

2 . حافة المستعمرة.

3 . إرتفاع المستعمرة.

المواد: Materials

- صحون بتري تحتوي على أجار مغذٍ NA (عدد 2) وصحن بتري يحتوي على TSA.

- مزارع على الأجار المغذي المائل لأنواع البكتيريا.

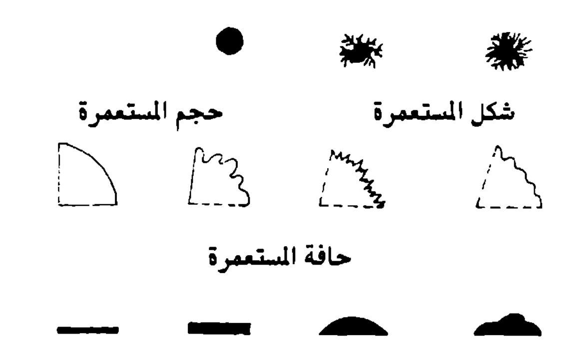
Streptococcus pyogenes, Proteus vulgaris, Bacillus subtilis

الطريقة: Procedure

1 . إزرع بطريقة التخطيط Streak صحن بتري يحتوي على أجار مغذٍ ببكتيريا **Bacillus subtilis** وضعه في الحاضنة في 30 درجة مئوية لمدة 48 ساعة.

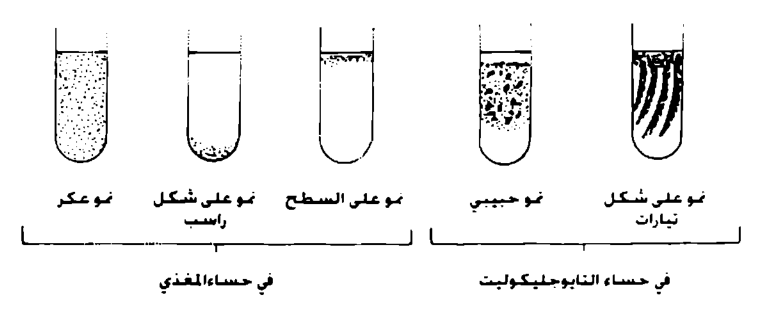
2 . إزرع كذلك بطريقة التخطيط صحن بتري يحتوي على TSA ببكتيريا **Streptococcus pyogenes**، وصحناً آخر يحتوي على أجار مغذي NA ببكتيريا **Proteus vulgaris** وضعهما في الحاضنة في 37 درجة مئوية لمدة 48 ساعة.

3 . بعد التحضين والنمو إفحص الصحون الثلاث من أجل دراسة شكل المستعمرات، لاحظ النمو المنتشر Spreading Growth للبكتيريا **Proteus vulgaris**.



إرتفاع المستعمرة (رؤية جانبية)

شكل (18). بعض أشكال النمو المميزة للمستعمرة البكتيرية



شكل (19). بعض أنماط النمو في أنواع مختلفة من الحساء Broths.

تمرين (16):

أشكال النموات البكتيرية في نوعين من المزارع السائلة.

Growth Patterns in two different Types of Broths

المواد: Materials

- مزارع مائلة Slant Cultures للبكتيريا. **Streptococcus pyogenes** **Bacillus subtilis** **E. coli**
- أنابيب تحتوي على حساء مغذي معقم NB (عدد 4).

ـ أنابيب تحتوي على Thioglycollate Broth (عدد 2).

الطريقة : Procedure

1 . إستعمل مزرعة مائلة لبكتيريا **E. coli** ومزرعة مائلة لبكتيريا **B. subtilis** وذلك بحقنها Inoculation في أنبوبتين منفصلتين تحتويان على حساء مغذي Nutrient Broth.

2 . أنقل بكتيريا **Streptococcus pyogenes** و **Staphylococcus aureus** من مزارع مائلة واحقنها منفصلة في أنابيب تحتوي على Thioglycollate Broth, NB . يجب الاهتمام عند نقل هذه البكتيريا باستعمال Aseptic Technique، نظراً لأنها ممرضة Pathogenic.

3 . ضع بكتيريا **B. subtilis** في 30 درجة مئوية وبقية الأنابيب في 37 درجة مئوية لمدة 48 ساعة.

4 . بعد التحضين Incubation سوف تلاحظ بأن نمو البكتيريا **S. aureus** و**S. pyogenes** في Thioglycollate Broth يختلف عن النموات في الوسط NB. هذا يمكن أن يساعد في تعريف البكتيريا.

5 . إرسم النموات المختلفة داخل الأنابيب وأعطِ وصفاً لهذه النموات، النمو السطحي Pellicle Growth لبكتيريا **B. subtilis** يمكن أن يظهر بعد أسبوع، لذلك بإمكانك ترك هذه المزرعة في الحاضنة لمدة أطول.

تمرين (17):

إنتاج الأصباغ في البكتيريا Production of Pigments by Bacteria

إنتاج الصبغات في البكتيريا من الأحسن دراستها بواسطة المستعمرات المعزولة لأن هذه المستعمرات تسهل عليك معرفة ما إذا كانت الصبغة قابلة

للذوبان في الماء Water - Soluble، أو غير قابلة Non soluble. الصبغة القابلة للذوبان في الماء تخرج من خلايا المستعمرة وتنتشر Diffuse في الوسط حول المستعمرات مما ينتج عنه تلون الوسط بلون الصبغة. أما إذا كانت الصبغة غير قابلة للذوبان في الماء، فإنها تبقى داخل الخلايا، ولهذا فإن المستعمرة فقط تتلون بلون الصبغة التي تنتجها.

أغلب البكتيريا لا تنتج أصباغاً Not Chromogenic ولهذا لون مستعمراتها أبيض White أو رمادي Gray. الأنواع القليلة من البكتيريا التي تنتج أصباغاً تكون ألوانها خضراء إلى زرقاء اللون Green to Blue، صفراء إلى برتقالي Yellow to Orange، حمراء إلى بنفسجية Red to Violet، أو درجات لون أخرى بين هذه الألوان. بعض الميكروبات الأخرى تنتج صبغة سوداء Black Pigment، وأغلب الصبغات غير قابلة للذوبان في الماء. كذلك هنا يمكن أن يكون إنتاج الصبغات في البكتيريا مفتاحاً في التعريف بنوع معين من البكتيريا.

المواد: Materials

- مزارع سائلة NB Culture <u>Pseudomonas aeruginosa</u>, <u>Serratia marcescens</u>.

- صحون بتري تحتوي على أجار مغذٍ (عدد 4).

الطريقة: Procedure

1. أحضر مزرعة سائلة NB Culture للبكتيريا <u>Pseudomonas aeruginosa</u>
2. إزرع هذه البكتيريا على صحن يحتوي على أجار مغذٍ.
3. ضع الصحن في الحاضنة في درجة 37 درجة مئوية لمدة 48 ساعة ثم ضع الصحن في الثلاجة.

4 . ضع صحن أجار مغذٍ آخر بدون زرع في الحاضنة وذلك للمقارنة Control Plate

5 . كرر نفس الطريقة مع بكتيريا **Serratia marcescens**

6 . بعد التحضين سوف تلاحظ بأن **P. aeruginosa** تنتج صبغة لونها أصفر مخضر Greenish - yellow، وهي قابلة للذوبان في الماء نظراً لتلون الوسط حول المزرعة، أما **S. marcescens** فإنها تنتج صبغة لونها أحمر وهي غير قابلة للذوبان في الماء حيث أن المستعمرة فقط يظهر لونها أحمر.

أسئلة:

1 . ما فائدة الدراسة والتعرف على النموات البكتيرية المختلفة؟

2 . لماذا نستعمل الزرع بطريقة التخطيط Streaking أثناء دراسة المستعمرات البكتيرية على الأجار؟

3 . لماذا استعمل الوسط Thioglycollate Broth كوسط سائل؟

4 . البكتيريا **Serratia marcescens** تنتج صبغة لونها أحمر عند تحضينها في درجة 37 مئوية ولكنها لا تنتج صبغة في درجة حرارة الغرفة (حوالي 25 درجة مئوية) لماذا؟

نقل الميكروبات من أنبوبة إلى أخرى
Aseptic Transfer of Microbes

بما أن الميكروبات متواجدة في كل مكان Omnipresent، لذلك يجب اتخاذ الاحتياطات اللازمة أثناء زرع أو نقل المزارع الميكروبية أثناء التجارب المعملية حتى لا تدخل على المزارع النقية ميكروبات غير مرغوب فيها

أو التعرض للإصابة بالميكروبات التي يتم نقلها Unwanted Organisms وخاصة أثناء العمل بميكروبات ممرضة Pathogens. بكتيريا غير مرغوب فيها يمكن أن تدخل عن طريق الاتصال المباشر Direct Contact بسطح الأيدي، أي بلمس الأوساط المغذية المعقمة أو السطح الداخلي لأنابيب الاختبار المعقمة بأي شيء غير معقم. ولأن البكتيريا تتواجد طبيعياً في الهواء Airborne فبالإمكان أن تدخل إلى صحون بتري وداخل الأنابيب عن طريق التيارات الهوائية Air Currents. يوجد عدة تقنيات تتفادى عند اتباعها دخول هذه الميكروبات وتمنعها من تلويث المزارع البكتيرية والنظرية النقية Bacterial and Fungal Pure Cultures. هذه التقنيات المختبرة تسمى Aseptic Techniques. إتباعك لهذه التقنيات أثناء العمل بالميكروبات يقلل بنسبة كبيرة من التلوث، أو الإصابة بالعدوى عن طريق الميكروبات. تذكر دائماً بأن المزرعة النقية Pure Cultures هي تلك المزرعة التي تحتوي كل مستعمراتها على نوع واحد single species ونفس النوع The same Species للميكروبات (بكتيريا أو فطريات).

في هذا التمرين سوف تتعلم خطوة بخطوة Step - by - step كيف تنقل المزارع النقية للبكتيريا من أنبوبة اختبار معقمة إلى أخرى Tube Transfer دون التعرض إلى ميكروبات خارجية خاصة عن طريق الهواء.

تمرين (18):

التدريب على نقل الميكروبات في الأنابيب Practice of Aseptic Tube transfer

المواد: Materials

- مزرعة الأجار المائل لنوع من البكتيريا Slant Culture
- أجار مائل معقم (3 أنابيب) NA Slants.

ـ أنبوبة حساء مغذٍ معقم Sterile Tube of NB.

ـ أنابيب فارغة معقمة وبغطاء (عدد 2) Empty Test Tubes.

ـ حامل أنابيب Test Tube Rack.

ـ معدات الزرع Inoculating Equipment.

الطريقة: Procedure

بعناية تتبع الأشكال من 20 إلى 34 والشرح تحت كل شكل. بإمكانك تجريب أنابيب اختبار فارغة بدون مزرعة Dry Runs.

تمرين (19):

استعمال الماصة المصلية Aseptic Use of Serological Pipet

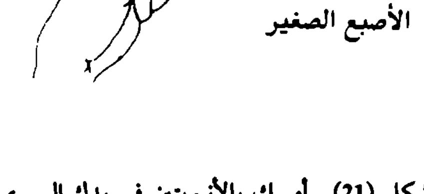
في علم الأحياء الدقيقة غالباً ما تدعو الضرورة إلى نقل كميات معينة من مزرعة وسط حسائي Nutrient Broth Culture. هذا يستدعي استعمال ماصة مصلية Serological Pipet. هذا النوع من الماصات يختلف عن الماصة الحجمية Volumetric Pipet التي تستعمل في معامل الكيمياء وذلك بأنها مدرجة مما يجعلك تعرف كميات السائل المنقول. يوجد عدة أنواع من الماصات ذات أحجام مختلفة. في هذا التمرين سوف نستعمل فقط نوعين من الماصات (1 مل و 10 مل).

من أهم الأشياء عند نقل المزارع البكتيرية السائلة Bacterial Broth Culture هي طريقة الاحتفاظ بالماصة وأنابيب المزارع في يدك. إستعمال الماصة في نقل المزارع يختلف بعض الشيء عن استعمال حلقة الزرع المعدنية Inoculating Loop.

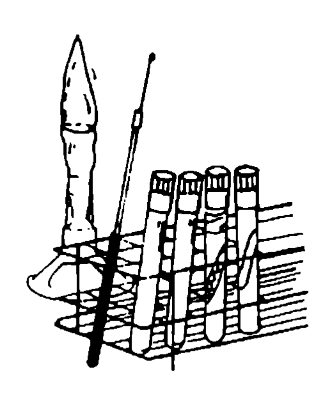
المواد: Materials

- لهب.
- حامل الأنابيب.
- ماصة نظيفة ذات 1 مل.
- ماصة معقمة مقفولة بقطن ذات 1 مل.
- ماصة نظيفة ذات 10 مل.
- ماصة معقمة مقفولة بقطن ذات 10 مل.
- أنبوبة اختبار فارغة بغطاء.
- أنبوبة اختبار بغطاء تحتوي على 5 مل ماء صنبور.
- قنينة مقفولة بقطن تحتوي على ماء صنبور.
- صحن بتري فارغ معقم.
- أنبوبة بها حساء مغذ.
- قنينة مقفولة بقطن بها 50 مل حساء مغذ.
- مزرعة سائلة لبكتيريا E. coli.

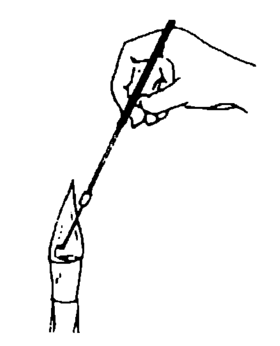
الطريقة: Procedure



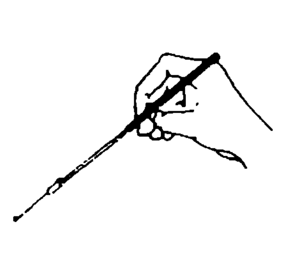
شكل (21). أمسك بالأنبوبتين في يدك اليسرى (أو في يدك اليمنى إذا كنت يساري اليد).



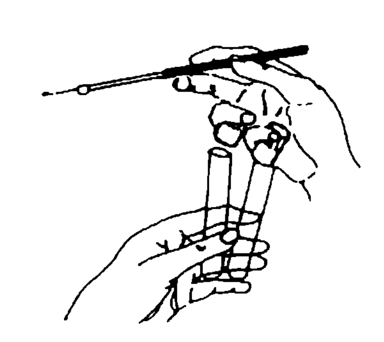
شكل (20). المعدات المطلوبة. حلقة الزرع Loop يجب أن تكون مقفولة (Circle).



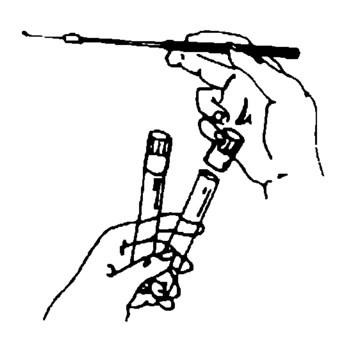
شكل (23). عرّض حلقة الزرع للنار كما يظهر في الصورة. أترك الحلقة لكي تبرد حتى لا تقتل البكتيريا المنقولة.



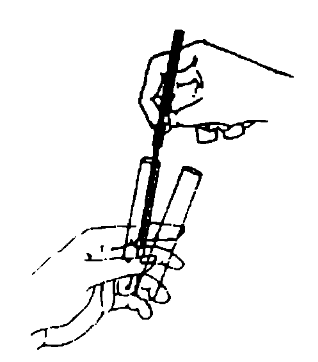
شكل (22). أمسك بحلقة الزرع في يدك اليمنى (أو في اليسرى إذا كنت يساري اليد)، كما تمسك بقلم الرصاص.



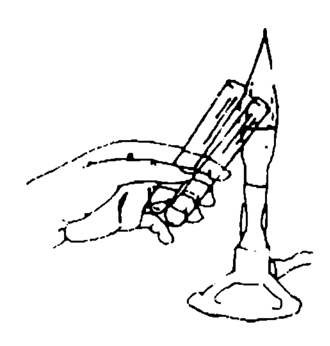
شكل (25). أبعد الآن غطاء الأنبوبة الثانية بنفس الطريقة كما هو موضّح.



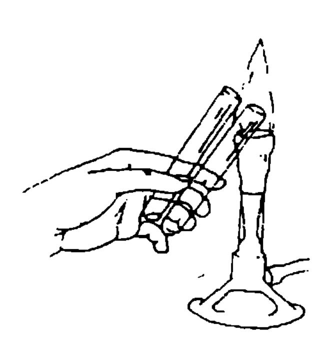
شكل (24). أبعد غطاء الأنبوبة الأولى كما هو موضح. إلمس فقط الجزء العلوي من الغطاء لتفادي التلوث.



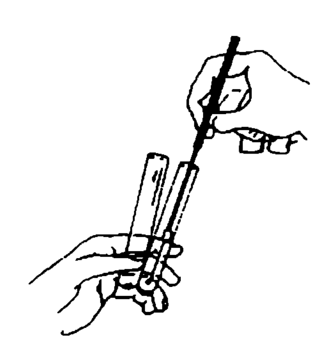
شكل (27). أدخل حلقة الزرع داخل المزرعة النقية وانقل كمية قليلة من البكتيريا.



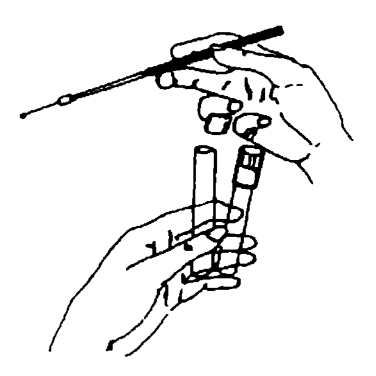
شكل (26). عرّض رقبة الأنابيب للّهب بالتمرير مرتين. إحتفظ بالأنابيب عمودياً.



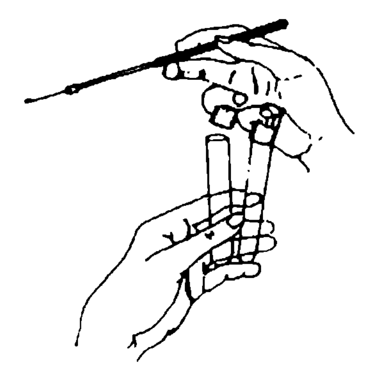
شكل (29). عرّض رقبة الأنبوبتين للّهب.



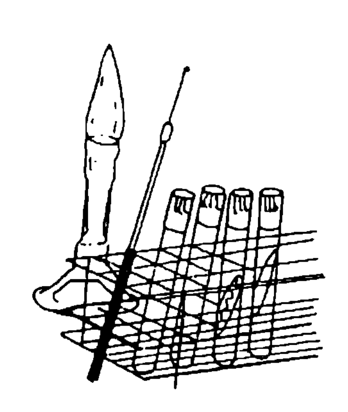
شكل (28). أنقل هذه الحقنة على سطح الأجار المائل في الأنبوبة.



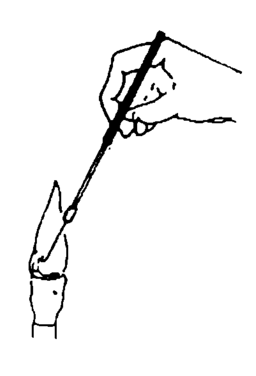
شكل (31). الآن ضع غطاء الأنبوبة الثانية.



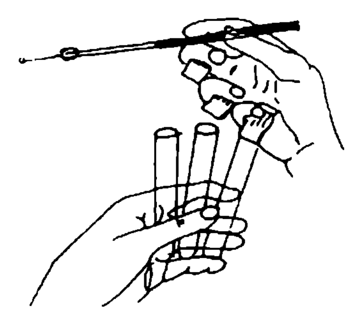
شكل (30). ضع العطاء كل على الأنبوبة الخاصة به مبتدأ بالأنبوبة الأولى التي أبعدت غطاؤها.



شكل (33). أرجع الأنابيب وإبرة الزرع إلى حامل الأنابيب.



شكل (32). عرّض إبرة الزرع للنار ثانية لقتل البكتيريا المتواجدة عليها



شكل (34). ثلاث أنابيب بأغطيتها يمكن إجراؤها في وقت واحد عندما تبدع هذه التقنية. لقاح واحد كاف لحقن كلا الأنبوبتين.

من أجل استعمال جيد للماصة أثناء العمل بها عليك باتباع الخطوات التالية:

1 . أمسك بالأنبوبة المغطاة Capped Test Tube في يدك اليسرى.

2 . أمسك بالماصة في يدك اليمنى (شكل 35).

3 . أبعد غطاء أنبوبة الاختبار بواسطة الإصبع الصغير Little Finger ليدك اليمنى مع برم الإصبع حول الغطاء.

4 . عرّض مقدمة الأنبوبة المفتوحة للهب تفادياً للتلوث بالميكروبات الخارجية إذا كان ذلك ضرورياً (If Asepsis is Required). من الأفضل التدرب على هذه الخطوة عدة مرات حتى وأنت لا تشتغل بأدوات ومواد معقمة.

5 . غطّس مقدمة الماصة في داخل السائل (أو مزرعة سائلة لبكتيريا **E.coli**).

ملاحظة هامة:

إذا لم تبقَ مقدمة الماصة مغطّسة داخل السائل خلال مدة أخذ السائل بالماصة Pipetting Process، فإن السائل ربما يدخل فمك، وهذا خطير جداً في حالة عملك بمزارع بكتيرية.

6 . باستعمال الإصبع المؤشر Forefinger لليد اليمنى وهو الإصبع الذي يستعمل في قفل وفتح مرور السائل في الماصات Pipetting Finger (شكل 36)، ضع مؤخرة الماصة في فمك وببطء إسحب السائل في الماصة Gentle Suction. حافظ على جفاف شفتيك أثناء إجراء هذه الخطوة.

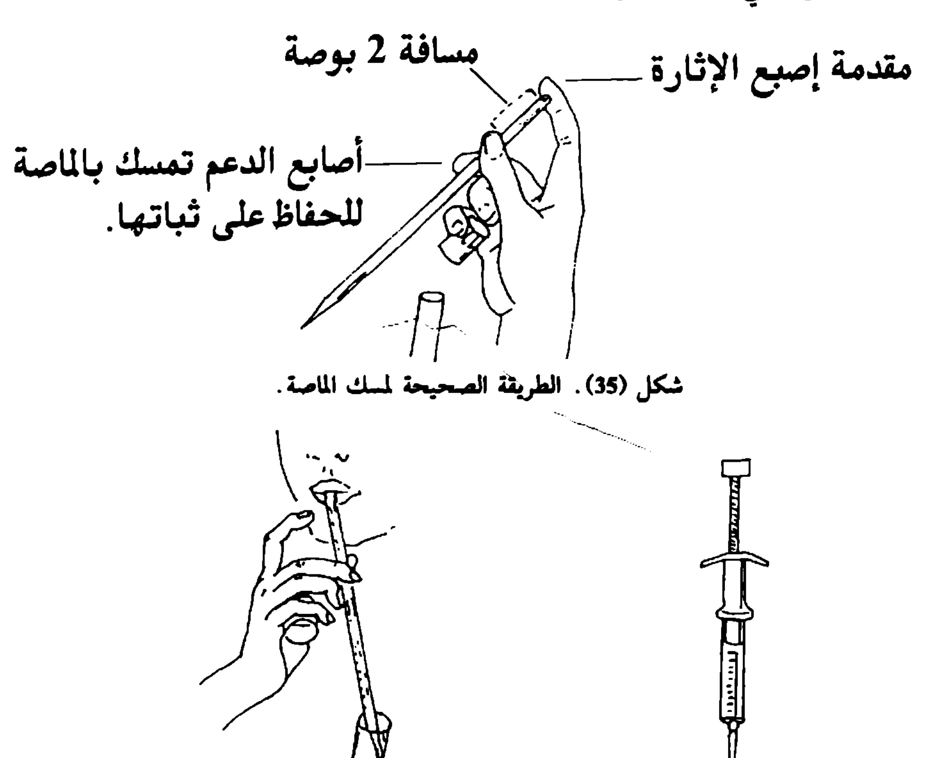
7 . عندما يرتفع السائل أعلى من علامة الصفر Zero على الماصة، بسرعة أبعد الماصة عن فمك وضع نهاية إصبع التأشير Forefinger ليدك اليمنى على فتحة نهاية الماصة (شكل 36). إحتفظ دائماً بمقدمة فمك جافة حتى تتحكم جيداً في سحب السائل.

8 . بواسطة رخي Relax إصبع التأشير بعض الشيء إسمح بهبوط السائل إلى

نقطة الصفر، يمكن الآن نقل كمية محددة من السائل إلى أنبوبة الاختبار الفارغة. تذكر قراءة قاع السطح الهلالي للسائل Meniscus.

9 عرض فتحة أنبوبة الاختبار المحتوية على السائل للهب قبل قفلها، هذا ضروري خاصة عند نقل السوائل المعقمة إلى الأنابيب Aseptic Transfer.

10 مع الحفاظ على إصبعك ضاغطاً على فتحة نهاية الماصة، ضع الآن الغطاء على الأنبوبة التي أخذت منها السائل (الماء). أنت ما زلت تحتفظ بالأنبوبة في يدك اليسرى.



شكل (35). الطريقة الصحيحة لمسك الماصة.

شكل (36). أمسك بمقدمة الماصة بواسطة الشفاه الجافة، بينما يكون إصبع الإشارة لليد اليمنى في استعداد لقفل وفتح الماصة.

إستعمل جهاز سحب السوائل عندما تستعمل محاليل بكتيرية حية.

11. أرجع الأنبوبة المغطاة إلى حامل الأنابيب بواسطة يدك اليسرى. الآن وبعد أن أصبحت يدك اليسرى حرة (ليس بها شيء)، إلتقط بها الأنبوبة التي تريد أن تنقل إليها كمية السائل الموجودة في الماصة. أثناء عمل هذه الخطوة لا تقلب الماصة حتى لا يخرج منها السائل وينصب على يدك.
12. أبعد غطاء الأنبوبة بواسطة الإصبع الصغير ليدك اليمنى.
13. عرض فوهة الأنبوبة للهب إذا كان ذلك ضرورياً Asepsis.
14. أدخل الماصة في الأنبوبة، وبواسطة ارتخاء إصبع التأشير بعض الشيء من على فتحة الماصة أفرغ الكمية المطلوبة من السائل في الأنبوبة. إذا كانت الأنبوبة تحتوي على سائل آخر، لا تدع مقدمة الماصة تلمس هذا السائل أثناء التفريغ.
15. عرّض فوهة الأنبوبة للهب من جديد.
16. ضع الغطاء على الأنبوبة.
17. ضع الماصة وما تحتويه من بقية المزرعة السائلة في الإناء المخصص لذلك (إناء يحتوي على مطهر).
18. ضع الأنبوبة المحتوية على السائل المنقول على حامل الأنابيب.

ملاحظة: لا تستعمل فمك أثناء نقل مزارع سائلة تحتوي على كائن ممرض، إستعمل أداة مص السوائل **Pipetting Bulb**، أو محقنة معقمة **Sterile Syringe**. بكتيريا القولون **E. coli** تعتبر من البكتيريا المتواجدة طبيعياً في الجهاز الهضمي، ولا يوجد خطر كبير أثناء نقلها باستعمال الفم **Mouth Pipetting**.

تمرين (20):

التدريب على نقل الماء باستعمال الماصة حجم 1 مل.

Practice Transfer of Water Using 10 ml Pipet

باستعمال الأنبوبة المغطاة والمحتوية على ماء، أنقل 0.6 مل من الماء

بواسطة ماصة حجم 1 مل إلى أنبوبة اختبار أخرى فارغة ومغطاة Capped Tube. تتبع جميع الخطوات المذكورة أعلاه، كذلك كرر التمرين عدة مرات حتى تصبح متقناً له. لا تنسَ العمل بتجنب التلوث Asepsis، عندما تجد نفسك تتحكم في السائل داخل الماصة إبدأ في إجراء التمرين القادم.

تمرين (21):

التدريب على نقل الماء باستعمال الماصة حجم 10 مل.

Practice Transfer of Water Using 10 ml Pipet

أنقل 6 مل من الماء من قنينة مقفولة بقطن إلى أنبوبة اختبار فارغة بغطاء Capped Tube بواسطة ماصة حجم 10 مل. عندما تستطيع عمل هذا أنقل الكميات التالية: 6.1 مل، 6.3 مل، 6.9 مل. نظراً لأنك تستعمل أنبوبة اختبار واحدة لتنقل إليها هذه الكميات من الماء، لذلك أفرغ الماء من الأنبوبة بين كل نقلة وأخرى، ثم ابعد وأرجع غطاء الأنبوبة في كل مرة.

أسئلة:

1. عرف المزرعة النقية Pure Culture.
2. عند نقل مزارع الميكروبات النقية من إناء إلى آخر، ما هي مصادر التلوث المختلفة التي يمكن أن تتسبب في تلوث هذه المزارع النقية؟
3. ما الفرق بين الماصة المصلية والماصة الحجمية؟
4. لماذا يجب أن لا تستعمل فمك أثناء نقل ميكروبات ممرضة Pathogenic باستعمال الماصة؟
5. ما المقصود بـAseptic Technique عند زرع ونقل الميكروبات؟

الباب الثالث

الفحص المجهري للبكتيريا

Microscopic observation of bacteria

مشاهدة البكتيريا الحية بالطريقة المبتلة Preparing a Wet mount

يوجد طريقتان لتحضير عينة من الميكروبات للمشاهدة تحت المجهر الضوئي:

1 . مشاهدة الميكروبات الحية بطريقة wet mount.

2 . طريقة اللطخة المصبوغة stained smear.

الطريقة الثانية وهي اللطخة المصبوغة تعتبر أكثر استعمالاً للمشاهدة المجهرية للبكتيريا ولكن بهذه الطريقة ترى فقط بكتيريا ميتة dead أو fixed. بواسطة هذه الطريقة تستطيع أن تعرف بأن البكتيريا سالبة أو موجبة لصبغة جرام، ترى شكل البكتيريا (عصوية، كروية، أو لولبية. . . إلخ) وكذلك بمساعدة هذه الطريقة تشاهد التنظيمات أو الترتيبات Arrangement المختلفة للخلايا البكتيرية. لكن باستعمال هذه الطريقة ليس بإمكانك معرفة ما إذا كانت البكتيريا متحركة Motile مشاهدة ميكروبات حية living microorganisms وخاصة بكتيريا حية تحت المجهر يتطلب منك الحفاظ على الخلايا حية، أي يجب عليك حفظها في بيئة سائلة Liquid environment. أغلب البكتيريا تموت بسرعة إذا لم تتوفر لها رطوبة Moisture كافية.

يوجد اثنان من التحضيرات Preparations لمشاهدة البكتيريا حية:

أ ـ الطريقة المذكورة أعلاه وهي بواسطة الطريقة المبتلة wet mount.

ب ـ القطرة المعلقة Hanging drop.

في كلا الحالتين تستعمل قطرة واحدة من السائل المحتوي على الميكروبات الحية. القدرة على مشاهدة البكتيريا حية تساعدك في معرفة الآتي:

1 . حجم وأشكال الكائن الدقيق الحي.

2 . الخواص التركيبية أو التجمعات للخلايا البكتيرية.

3 . إذا ما كان الميكروب متحركاً Motile أو غير متحرك Non-motile.

المواد: Materials

ـ نقع التبن Hay Infusion.

ـ مزارع سائلة لأنواع مختلفة من البكتيريا **Bacillus, Rhodomicrobium, Staphylococcus**.

- مزارع سائلة لبكتيريا غير معرفة Unknown Bacteria.
- شرائح مجهرية نظيفة (عدد 6) Microscope Slides.
- أغطية شرائح زجاجية (عدد 6) Glass cover slips.
- قطارات طبية Medicine Dropers
- ماء من البركة Pond water
- هلام نفطي Petroleum jelly
- عيدان أسنان Toothpicks.

نقع التبن Hay infusion يتم تحضيره بأسبوع قبل إجراء التمرين، وذلك

بوضع بعض من التبن أو القش الجاف في إناء زجاجي beaker يحتوي على حوالي 600 ـ 700 مل من الماء المقطر وتركه لمدة أسبوع في المعمل. يمكن إبعاد فقاعات الهواء من الإناء بواسطة أنبوبة مطاطية.

تمرين (22):

مشاهدة الميكروبات الحية في نقع التبن (القش)

Preparing of a wet mount using hay infusion:

العالم Anthony van Leeuwenhoek يعتبر أول من استعمل نقع القش Hay infusion في نهاية القرن السابع عشر لدراسة أشكال، تركيبات وحركة الميكروبات.

الطريقة : Procedure

1 . باستعمال عود أسنان Toothpick للتخليط إعمل مربعاً من مادة الهلام النفطي Petroleum Jelly بحجم الحافات الخارجية لغطاء شريحة Cover Glass على شريحة نظيفة كما هو موضح في شكل (37 أ).

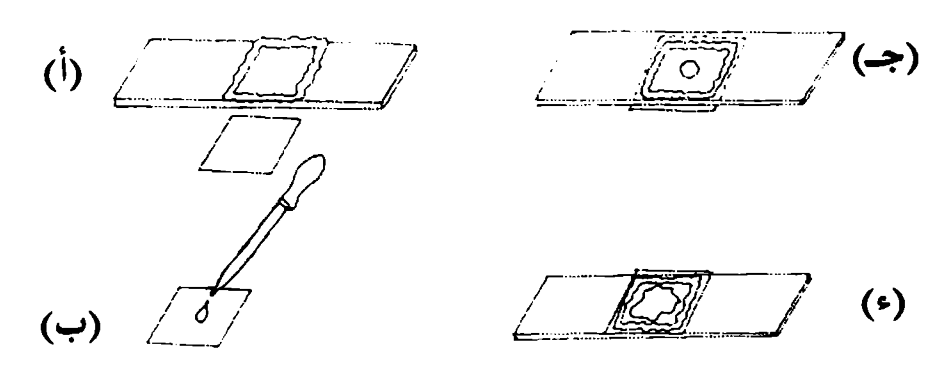
2 . بواسطة قطارة طبية Medicine dropper ضع قطرة من نقع القش في مركز غطاء الشريحة (شكل 37 ب).

3 . أقلب الشريحة بحيث تكون مادة الهلام النفطي إلى أسفل وبحذر اجعلها تلمس غطاء الشريحة. تأكد من جعل قطرة نقع القش في مركز المربع المحاط بمادة الهلام النفطي، كما في شكل (37 ج).

4 . خذ الشريحة الملتصق بها قطرة نقع القش وغطاء الشريحة من طرفيها واقلبها بحيث يصبح الآن غطاء الشريحة إلى أعلى كما في شكل (37 د). غطاء الشريحة يجب أن يلتصق من جوانبه بمادة الهلام النفطي حتى تتوزع قطرة نقع القش بين الشريحة وغطاء الشريحة في المربع المخصص لذلك.

5 . لقد حضرت الآن Wet Mount وما عليك إلاً دراسته تحت المجهر،

ضع الشريحة تحت المجهر، قلل من قوة الضوء الساقط على العينة، ثم حدد الميكروبات في عينة نقع القش بالعدسة الصغرى (× 10) وغيّر بعد ذلك للعدسة الكبرى (× 40). لا تنس بأن التغيير من عدسة إلى أخرى يتطلب منك تعديل قوة الإضاءة النافذة خلال العينة بواسطة المكثف Condenser أو Iris Diaphragm أو الاثنين معاً.



شكل (37). تحضير عينة بالطريقة المبتلة Wet Mount.

6 . إرسم ثلاثة كائنات حية دقيقة مختلفة تشاهدها في عينة نقع القش واكتب وصفاً عاماً لهذه الكائنات الحية مستعيناً بشكل (38) وشكل (39).

تمرين (23):

مشاهدة مزارع سائلة لأنواع مختلفة من البكتيريا

Preparing a wet Mount using Bacterial Broth Cultures

حضر بنفس الطريقة السابقة (تمرين 22) Wet Mount لمزارع مختلفة من البكتيريا التي قمت بتجهيزها مثل Bacillus subtilis وغيرها.

تمرين (24):

مشاهدة الميكروبات الحية في قطرة من ماء البركة.

Preparing a wet mount using Pond water

بعد جلب ماء البركة إلى المعمل سوف تلاحظ بأنه يحتوي على كائنات

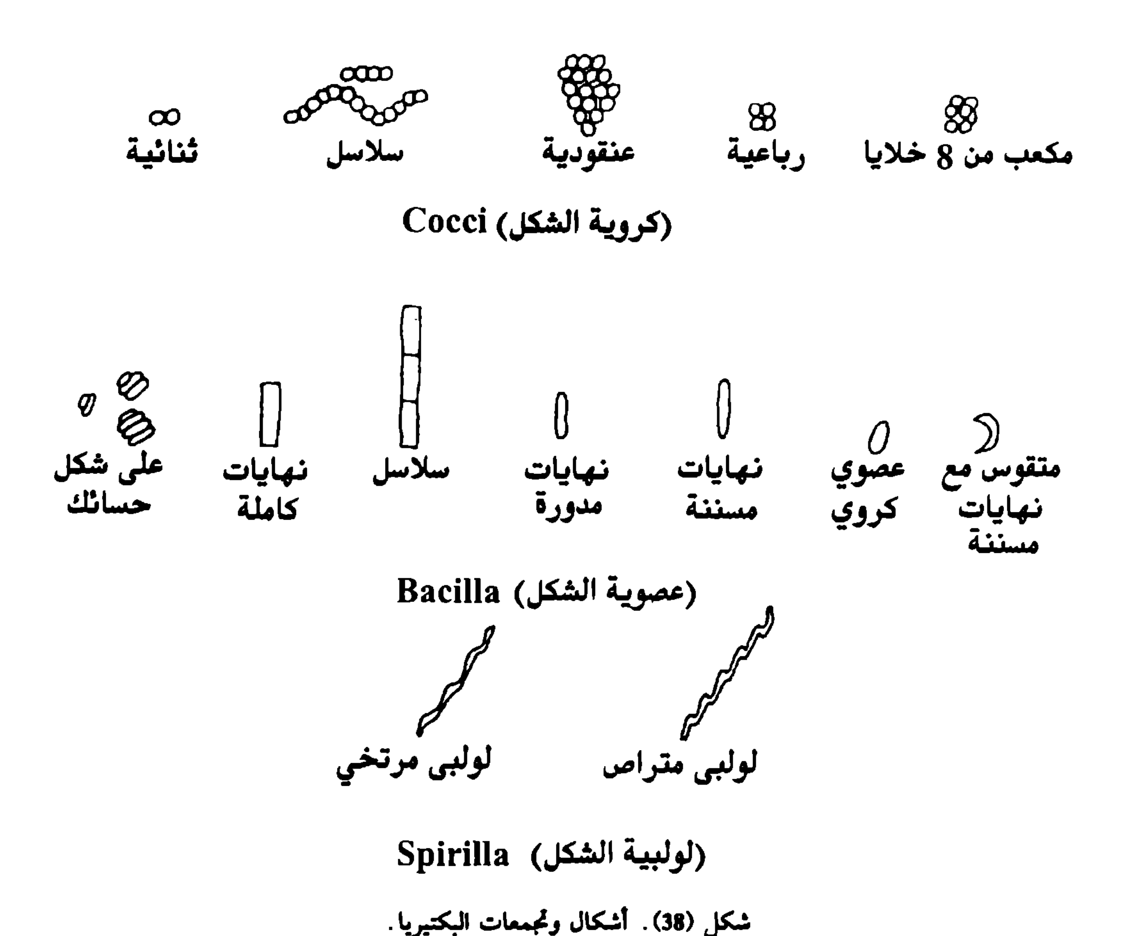
حية دقيقة مختلفة، بعضها من ذات الخلية الواحدة One-celled والآخر من ذوات الخلايا المتعددة Multicellular.

أسئلة:

1 . قارن بين طرق مشاهدة البكتيريا الحية والبكتيريا المثبتة والمصبوغة.

2 . ما هي مزايا مشاهدة البكتيريا حية تحت المجهر؟

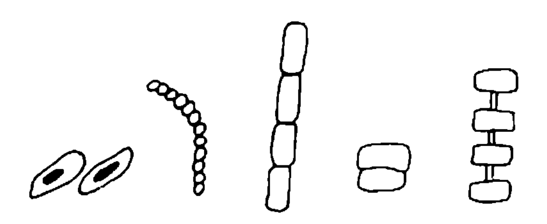
3 . لِمَ اختير نقع التبن Hay Infusion لمشاهدة الميكروبات الحية؟



شكل (38). أشكال وتجمعات البكتيريا.



بعض أنواع الحيوانات ذات الخلية الواحدة



بعض أنواع الطحالب

شكل (39). بعض من أنواع الخلايا النباتية والحيوانية التي يمكن ملاحظتها في قطرة من نقع القش
Hay infusion wet Mount

دراسة حركة البكتيريا
Bacterial Motility

أغلب البكتيريا التي تتحرك تكون حركتها بواسطة الأسواط Flagella. هذه الزوائد الشعرية تدفع الخلية البكتيرية خلال الوسط Medium المتواجدة فيه. الأسواط تنشأ من الجانب الداخلي لغشاء الخلية وتتخلل الغشاء وجدار الخلية إلى الخارج. أغلب البكتيريا ذات الأسواط تكون عصوية Bacilli ولكن هناك بعض الأنواع Species تكون كروية Cocci، هناك على الأقل ثلاث طرق للكشف على الأسواط في البكتيريا.

1 . طريقة القطرة المعلقة The Hanging - drop Technique

2 . طريقة الحركة في الأجار شبه الصلب The Motility Agar Technique

3 . طريقة صبغ الأسواط The Flagellar Stain

تمرين (25):

طريقة القطرة المعلقة Hanging - drop Technique (شكل 40).

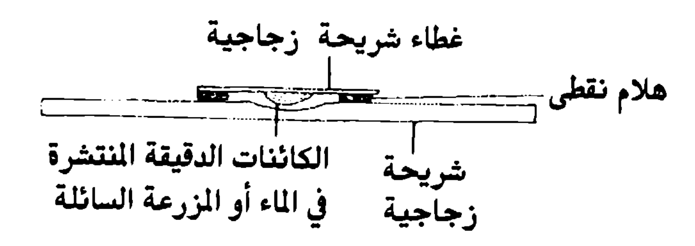
البكتيرية المحتوية على الأسواط تظهر حركة في اتجاه معين Directional Movement والتي يمكن اكتشافها في قطرة من وسط مغذ سائل Liquid Medium بواسطة العدسة الزيتية المنغمسة. الحركة في البكتيريا يمكن أن تكون في أي اتجاه ولكن البكتيريا تستمر في الحركة في هذا الاتجاه لعدة لحظات بعكس حركة Brownian Movement التي تعتبر عشوائية وتزداد بزيادة درجة حرارة الوسط.

المواد: Materials

- مزارع سائلة صغيرة العمر (24 ـ 18 ساعة) للبكتيريا **Proteus vulgaris** **Staphylococcus epidermidis**, Unknown Bacteria
- شريحة ذات تجويف Slide with a concave Depression
- غطاء شريحة Coverslip.
- هلام نفطي Petroleum Jelly.
- قضيب خشبي Applicator Stick.
- ماصة باستور Pasteur Pipette.

الطريقة: Procedure

1 . ضع كمية قليلة من Petroleum Jelly على حواف غطاء الشريحة بواسطة القضيب الخشبي (شكل 40).



شكل (40). طريقة تحضير القطرة المعلقة

2 . باستعمال ماصة باستور إسحب قطرة من مزرعة **Proteus vulgaris** وضعها في مركز غطاء الشريحة.

3 . أقلب غطاء الشريحة الزجاجي بحركة سريعة بحيث تصبح القطرة معلقة في مركز غطاء الشريحة.

4 . بحذر ضع غطاء الشريحة فوق تجويف الشريحة واضغط على حواف غطاء الشريحة بحيث تصبح القطرة معلقة داخل التجويف.

5 . أدرس الشريحة بالعدسة الصغرى (× 10) للمجهر.

6 . بعد التأكد من أن حقل الرؤية Field of Vision يكون قرب القطرة غيّر إلى العدسة الزيتية (× 100)، عدل الإضاءة وابحث عن عصويات صغيرة، عندما تجد خلية بكتيرية لاحظ طريقة حركتها. لاحظ بأن هذه الخلية تقوم بحركة «Wig - Wag» وتستمر في الحركة في نفس الاتجاه لعدة ثوان في كل مرة. حرك إلى أعلى وإلى أسفل Focus up and Down لملاحظة خلايا أخرى وسوف تتأكد من أن كل الخلايا تتحرك بنفس الطريقة.

7 . أبعد غطاء الشريحة ونظفه وكرر نفس الطريقة باستعمال Staphylococcus epidermidis. سوف تلاحظ بأن هذه الخلايا الكروية تتحرك بطريقة شاذة أو مرجوجة (Erratic (Jerky، والتي تعرف بحركة Brownian Movement في البكتيريا التي لا تحتوي على أسواط Flagella.

8 . كرر الطريقة مع بكتيريا مجهولة Unknown وسجل ملاحظاتك.

تمرين (26):

طريقة الحركة في الأجار شبه الصلب The Motility Agar Technique

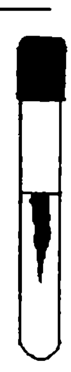
باستعمال أجار شبه صلب (نصف صلب) Semi-Solid الذي يستعمل في معامل الأحياء الدقيقة بكثرة يمكن إثبات قدرة البكتيريا على الحركة داخل الوسط. وتتلخص هذه الطريقة في حقن البكتيريا بواسطة الإبرة Needle في أنبوبة تحتوي على هذا الأجار Deep ثم وضع الأنبوبة في الحاضنة، وملاحظة نمط أو شكل النمو. إذا تكاثرت الخلايا خارج خط الزرع «Inoculation Stab»، فإن البكتيريا تحتوي على أسواط (شكل 41)، أما إذا كان النمو ضعيفاً وفي خط الزرع فقط فإن البكتيريا لا تحتوي على أسواط.

المواد: Materials

1 . ميز Label الثلاث أنابيب اختبار المحتوية على وسط اختبار الحركة Motility Testy بأسماء البكتيريا المذكورة أعلاه.

2 . عرض إبرة الزرع للهب.

3 . ابعد غطاء الأنبوبة المميزة ببكتيريا **P. vulgaris**.



شكل (41). الحركة في البكتيريا يمكن إثباتها بظهور منطقة عريضة من النمو في وسط نصف متصلب.

4 . إزرع بواسطة الإبرة المعقمة والباردة بكتيريا **P. vulgaris** في الأنبوبة المحتوية على أجار اختبار الحركة الخاصة بها وذلك بغطس الإبرة في الأجار العميق Deep Agar إلى عمق نصف الأنبوبة.

5 . كرر الطريقة مستعملاً **S. epidermidis** والبكتيريا المجهولة Unknown.

6 . ضع الأنابيب الثلاث في الحاضنة في درجة 37 درجة مئوية لمدة 48 ساعة.

7 . قارن بين مسار النمو في الأنابيب الثلاث وسجل نتائجك حول حركة البكتيريا.

تمرين (27):

طريقة صبغ الأسواط The Flagellar Stain (Leifon's Method)

الأسواط البكتيرية دقيقة جداً ولذلك هي صعبة الرؤية. لهذا السبب صبغ الأسواط يشمل ترسيب Precipitation الصبغة على جدار الخلية وعلى الأسواط. طريقة التغليف Coating هذه تزيد من حجم الخلية وقطر الأسواط مما يجعل الأسواط سهلة الرؤية. صبغ الأسواط يجب عمله بعناية فائقة مستعملاً مزرعة صغيرة العمر وشريحة نظيفة جداً، كذلك يجب معاملة الخلايا بحذر وذلك للحفاظ على الأسواط سليمة Intact على سطح الخلية.

المواد: Materials

- مزرعة سائلة للبكتيريا **Proteus vulgaris** صغيرة العمر (24 ـ 18 ساعة).

- شرائح زجاجية (عدد 4) بعد غمرها في Chromic Acid لمدة 12 ساعة وغسلها بماء مقطر.

- ماصات باستور Pasteur Pipettes.

ـ جهاز طرد مركزي Centrifuge.

ـ زجاجة تحتوي على صبغة Leifson's Flagellar Stain جديدة التحضير Freshly ومرشحة Filtered.

الطريقة: Procedure

1 . ركز Concentrate النمو البكتيري في المزرعة السائلة وذلك في جهاز الطرد المركزي بسرعة منخفضة لمدة 5 دقائق.

2 . باستعمال ماصة باستور إسحب الجزء السائل **Supernatant** من الأنبوبة أو أبعده لأنك لا تحتاجه في التمرين.

3 . أضف ثلاث مل من الماء المقطر للراسب Sediment، وذلك بالرج البطيء (الرج السريع يمكن أن يسبب في فصل الأسواط من الخلايا).

4 . ركز من جديد المحلول البكتيري Bacterial Suspension.

5 . أضف 0.5 مل من الماء المقطر إلى الراسب واخلطه ببطء Gentle Shaking.

6 . إسحب قطرة من المحلول البكتيري وضعها على أحد جوانب الشريحة.

7 . إرفع الشريحة من جانب القطرة حتى لا تندفع القطرة على بقية سطح الشريحة.

8 . أبقِ رافعاً للشريحة حتى تجف اللطخة بالكامل، لا تسخن الشريحة.

9 . أغمر اللطخة بصبغة Leifson واترك الصبغة على الشريحة لمدة 10 دقائق.

10 . بعد 10 دقائق أبعد الصبغة الزائدة مستعملاً Blotting paper ثم اغسل الشريحة بهدوء بالماء واترك اللطخة المصبوغة تجف بالكامل.

11 . أدرس البكتيريا المصبوغة بواسطة العدسة الزيتية لمجهرك، ربما تشاهد أسواطاً منفصلة من البكتيريا، حاول مشاهدة خلايا بالأسواط. سجل نمط ونوع الأسواط على الخلايا.

12 إذا لم تكن موفقاً في المرة الأولى، حاول إعادة التمرين بخطوات أكثر حذراً ودقة.

بالإضافة إلى هذه الطرق الثلاثة للكشف على الأسواط في البكتيريا فإن طريقة الكشف على الأسواط بواسطة المجهر الإلكتروني تعتبر من أدق الطرق لإثبات وجود الأسواط في البكتيريا.

أسئلة:

1 . أذكر الطرق المختلفة للكشف على الأسواط في البكتيريا المتحركة.

2 . لماذا استعملنا الاجار شبه الصلب لإثبات حركة البكتيريا؟

3 . طريقة صبغ الاسواط من أجل رؤيتها تعتبر دقيقة جداً. لماذا؟

4 . ما هي أفضل طريقة للكشف على الأسواط في نظرك ولماذا؟

تحضير لطخة (غشاء) بكتيرية
Preparing a Bacterial Smear

طريقة تحضير لطخات أو أغشية بكتيرية على الشريحة هامة جداً، ويجب عملها من أجل صبغ البكتيريا ودراستها تحت المجهر، ونظراً لأن الخلايا البكتيرية صغيرة جداً فإن هناك عدة صعاب أثناء تحضير اللطخة أو الغشاء، لذا ينصح باتباع الآتي من أجل تحضير غشاء بكتيري جيد.

1 لا تستعمل شرائح مجهرية مخدوشة Scratched Slides نظراً لأن الخدوش على الشريحة يمكن اعتبارها خطأ بأنها ميكروبات.

2 . يجب استعمال شريحة مجهرية نظيفة جداً.

3 . تجنب عمل لطخات غليظة too Thick أو رقيقة جداً too Thin. في الحالة الأولى تتراكم الخلايا فوق بعضها ولا يمكن تحديد الخلية وفي الحالة الثانية ربما لا تستطيع رؤية أية خلايا.

الشريحة تكون غير نظيفة بسبب وجود مواد دهنية عليها أو غبار أو أوساخ أخرى واستعمالها في هذه الحالة يسبب الآتي:

1 . عدم بقاء البكتيريا في اللطخة أثناء عملية الصبغ ويمكن أن تمسح بسهولة Wash off.

2 . عند توزيع محلول البكتيريا على الشريحة فإنها تلتحم Coalesce أي بمعنى لا تبقى متوزعة.

3 . الأوساخ، الغبار وبقايا أخرى على الشريحة يمكن فهمها خطأ بأنها خلايا بكتيرية.

هناك مشكلة أخرى في الحصول على لطخة بكتيرية جيدة وهي كمية البكتيريا المنقولة على الشريحة. فعندما تكون كمية البكتيريا كبيرة Thick smear، فإنه ليس بالإمكان التخلل إلى اللطخة مما يجعل رؤية الخلايا البكتيرية صعبة نظراً لأن الخلايا متراصة على بعضها وفي هذه الحالة يصعب كذلك تحديد أشكال Shapes البكتيريا. عند تحضير اللطخات من مزارع صحون بتري أو من مزارع مائلة يمكن أن نواجه هذه المشكلة.

كذلك عندما تكون اللطخة رقيقة Thin Smear فإن عدد الخلايا البكتيرية تكون قليلة جداً ويصعب البحث عنها تحت المجهر. هذا يمكن أن يحدث عند تحضير لطخات من مزرعة سائلة Broth culture.

اللطخة المثالية هي التي تكون غير غليظة وغير رقيقة بحيث توجد خلايا متوزعة ومنفصلة عن بعضها يمكن تحديد أشكالها ودراستها بسهولة تحت المجهر.

تمرين (28):

تحضير لطخة من مزارع سائلة.

Preparing a smear From Bacterial Broth Cultures

المواد: Materials

- مزرعة سائلة من البكتيريا **Bacillus subtilis** في أنبوبة اختبار أو مزرعة سائلة لنوع بكتيري آخر.
- لهب Flame.
- خطاط شرائح Glass-marking pencil.
- حلقة زرع Inoculating loop

الطريقة: Procedure

1. أكتب على طرف الشريحة إسم البكتيريا وأية معلومات أخرى.
2. أخلط Mix البكتيريا المترسبة في قاع الأنبوبة عن طريق رج الأنبوبة إلى الأمام وإلى الخلف.
3. أنقل بحذر aseptically مقدار 2 إلى 3 حلقات مملوءة من محلول البكتيريا إلى مركز الشريحة. تأكد من تعقيم حلقة الزرع فوق اللهب في كل مرة تنقل فيها البكتيريا من الأنبوبة.
4. وزّع spread out البكتيريا فوق الشريحة بواسطة حلقة الزرع حتى تأخذ حوالي 1/4 حجم الشريحة.
5. أترك الشريحة لتجف في الهواء Air - Dry لمدة لا تقل عن 1/2 ساعة.
6. بعد جفاف الشريحة في الهواء ثبتها بالتسخين Heat Fix.

تمرين (29):

تحضير لطخة من مزرعة أجار مائل.

Preparing a smear From a Bacterial Slant Culture

المواد: Materials

- شرائح مجهرية نظيفة.
- مزرعة من الأجار المائل للبكتيريا **Escherichia coli**.
- حلقة زرع.
- لهب.
- خطاط شرائح.

الطريقة: Procedure

1 . اكتب على طرف الشريحة إسم البكتيريا.

2 . ضع قطرة صغيرة من الماء على وسط الشريحة.

3 . أنقل بواسطة حلقة الزرع ومتفادياً أي تلوث aseptically بعضاً من البكتيريا من أنبوبة الأجار المغذي المائل إلى قطرة الماء فوق الشريحة واخلط البكتيريا في قطرة الماء جيداً.

4 . وزّع مخلوط الماء والبكتيريا فوق ربع الشريحة تقريباً.

5 . جفف اللطخة في الهواء وثبتها بالحرارة.

أسئلة:

1 . ماذا يشترط في الحصول على غشاء أو لطخة بكتيرية جيدة؟

2 . ما المقصود بالغشاء البكتيري المثالي؟

صبغ البكتيريا
Staining of Bacteria

المركبات الكيميائية Chemical compounds التي تستعمل لصبغ الخلايا البكتيرية تسمى أصباغ dyes (stains). نحن نصبغ البكتيريا لتسهيل رؤيتها والتعرف عليها تحت المجهر نظراً لأن الخلايا غير المصبوغة unstained تعتبر شفافة transparent. الأصباغ تكون إما حمضية Acidic أو قلوية Basic. الأصباغ الحمضية مثل Eosin و Acid Fuchsin تملك جاذبية قوية تجاه الأجزاء القلوية في الخلية مثل مكونات السيتوبلازم cytoplasimic components التي تعتبر قلوية. الأصباغ القلوية مثل Methylene Blue, Crystal Violet, Safranin تملك جاذبية قوية تجاه الأجزاء الحمضية للخلية. السطح الخارجي للخلية البكتيرية له صفات حمضية Acidic Characteristics بسبب وجود عدد كبير من مجموعة الكربوكسيل (COOH) Carboxyl groups على السطح الخارجي للخلية البكتيرية. هذه بدورها تكون الجزئي الحمضي Acid Radicals للأحماض الأمينية Amino Acids والمعروف بأن جدار البكتيريا يحتوي على آلاف من هذه الأحماض الأمينية، لهذا عندما تأخذ هذه المجموعات في التأين Ionization يصبح سطح البكتيريا ذا شحنات سالبة.

$$COOH \xrightarrow{\text{تأين}} CO\overline{O} + H^{+}$$

في الطبيعة أيون الهيدروجين يعوض بأيون موجب آخر مثل أيون الصوديوم Na^{+} أو البوتاسيوم K^{+} وروابط أيونات الهيدروجين بالأكسجين ليتكون الماء، ويمكن توضيح سطح الخلية البكتيرية حيث الشحنات السالبة كالآتي:

$$\ominus\ominus\ominus\ominus\ominus \quad + \quad Na^{+} (n)$$

الأصباغ القلوية تحضر تجارياً على شكل أملاح Salts فمثلاً عندما تشتري صبغة Methylene Blue فهي في الواقع على شكل ملح الكلور Methylene blue Chloride. عندما يذاب هذا الملح في الماء Rehydration يتأين ليصبح محتوياً على شحنة موجبة على الجزء الملون من جزيء هذه الصبغة حيث يصبح MB^{+}. هذا هو السبب الذي يجعلنا نقول بأن صبغة Methylene blue قلوية لأن أثناء عملية Electrophoresis فإن أيونات MB^{+} تتحرك في اتجاه القطب السالب Negative Electrode، وكما نعرف في قوانين علم الكيمياء الشحنات المختلفة تتجاذب لبعضها، لهذا فإن جزيئات MB^{+} ترتبط أيونياً بالشحنات السالبة المتواجدة فوق سطح البكتيريا. عندما يحدث هذا تتلون الخلية البكتيرية ويمكن توضيح ذلك بالمعادلة الآتية:

$$\text{Bacterial cell surface}^{-}\ Na^{+} + MB^{+}Cl^{-} \longrightarrow$$

$$\text{Bacterial cell surface MB} + NaCl$$

تمرين (30):

الصبغ البسيط للبكتيريا **Simple Staining of Bacteria**

يعتبر صبغ البكتيريا بواسطة الصبغ البسيط Simple Staining تبادل الأيونات الموجبة والأيونات السالبة بين الجزيئات لتكوين رابطة أيونية ionic Bond. عندما نستعمل صبغة واحدة فقط single dye لصبغ البكتيريا فإننا نطلق على هذه الطريقة طريقة الصبغ البسيط.

المواد: Materials

- شرائح مجهرية نظيفة Clean Microscopic Slides.
- مماسك ملابس Clothspins.

ـ إبرة زرع Inoculating Loop.

ـ صبغة Methylene Blue.

ـ مزارع صغيرة العمر (أقل من 48 ساعة) للبكتيريا E. coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus، أو غيرها من البكتيريا.

الطريقة: Procedure

1 . حضر لطخات (أغشية) رقيقة Thin smears من كل البكتيريا المذكورة وجففها بالهواء وثبتها بالحرارة.

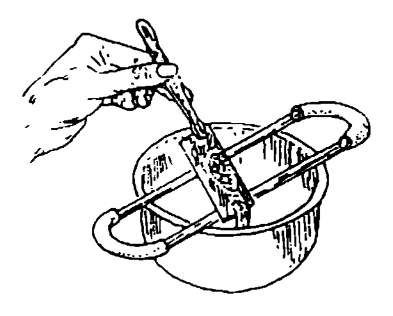
2 . ضع الشرائح على حامل الشرائح فوق الحوض ثم اغمرها بمحلول صبغة Methylene Blue لمدة دقيقة واحدة.

3 . ابعد الصبغة من فوق الشرائح واغسل الشرائح بتيار خفيف من ماء الصنبور (شكل 42).

4 . جفف الشرائح بورق Bibulous Paper لإبعاد قطرات الماء من فوقها، لا تضغط على الشرائح حتى لا تبعد الصبغة.

5 . افحص كل اللطخات المصبوغة تحت المجهر وذلك باستعمال العدسة الصغرى (× 10)، ثم ضع قطرة من الزيت وغيّر للعدسة الزيتية (× 100) Oil Immersion Lens.

6 . صف وارسم ما ترى تحت المجهر.



شكل (42). إرتشاح الصبغة من على اللّطخة البكتيرية قبل الغسل

تمرين (31):

صبغ البكتيريا بطريقة جرام The Gram Staining of Bacteria

الأصباغ التفريقية Differential Stains مفيدة جداً لأن باستعمالها نستطيع التفريق بين مجموعات البكتيريا. إحدى هذه الأصباغ المهمة هي صبغة جرام Gram stain. صبغ البكتيريا بهذه الطريقة يعتبر أحد أهم الخطوات في دراسة خواص البكتيريا أثناء تعريفها Identification في المعمل. هذه الطريقة استعملها لأول مرة العالم كريستيان جرام Christian Gram عام 1884م.
بواسطة صبغ البكتيريا بطريقة جرام نستطيع أن نقسم البكتيريا إلى مجموعتين:

- البكتيريا الموجبة لصبغة جرام Gram - Positive Bacteria.
- البكتيريا السالبة لصبغة جرام Gram - Negative Bacteria.

هذا الفرق ناتج عن الاختلاف في التركيب والمحتوى الكيميائي لجدار البكتيريا في هاتين المجموعتين.

المواد: Materials

- مزارع صغيرة العمر (24 ـ 48 ساعة) لأنواع البكتيريا الموجبة Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis
- مزارع صغيرة العمر (24 ـ 48 ساعة) لأنواع البكتيريا السالبة Escherichia coli, Neisseria subflava.

محاليل الأصباغ الآتية:

Safranin - Gram's Iodine - Crystal Violet

- محلول الكحول الإيثيلي تركيز 95 في المائة.

ـ شرائح نظيفة.

ـ إبرة تلقيح Inoculating needle

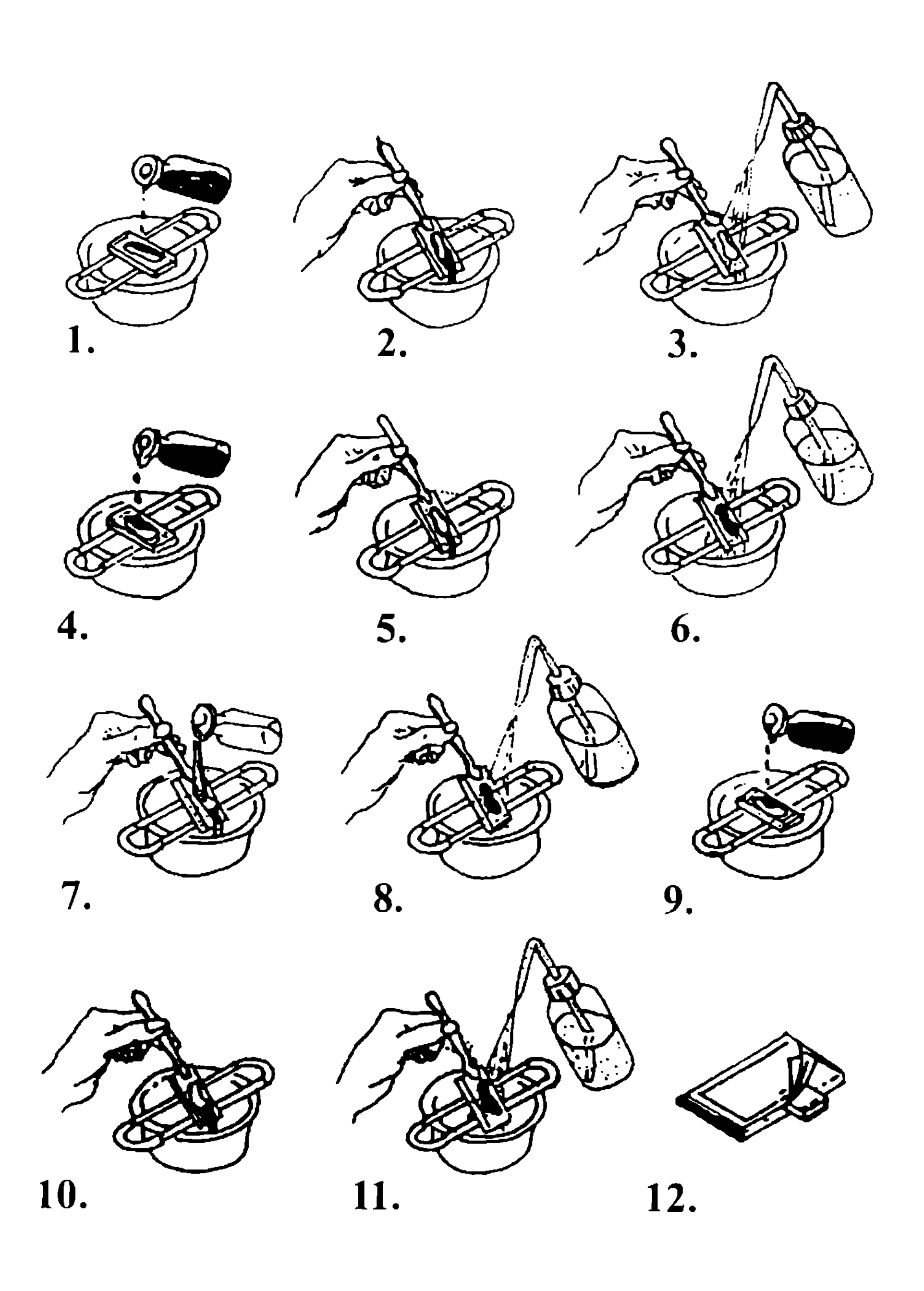
ـ مماسك ملابس Clothespins.

ـ لهب Flame.

ـ حوض به ماء صنبور Sink with Top water.

الطريقة : Procedure (شكل 43):

1 . حضر لطخة رقيقة Thin smear للبكتيريا. ربما ترغب في تحضير لطخة لنوع واحد من البكتيريا أو لطخة مختلطة Mixed smear عند تحضير لطخة مختلطة إمزج على شريحة نظيفة بكتيريا عصوية Rod - Shaped موجبة لصبغة جرام **(Bacillus)** مع بكتيريا كروية Coccal - shaped سالبة لصبغة جرام (Neisseria). على شريحة ثانية إخلط بكتيريا كروية موجبة **(Staphylococcus)** لصبغة جرام مع بكتيريا عصوية سالبة لصبغة جرام **(Escherichia)**.



شكل (43). صبغ البكتيريا بطريقة جرام **The Gram Stain Procedure**

2 . جفف اللطخات على صفيحة ساخنة Hot Plate وثبت البكتيريا باستعمال اللهب لمدة قصيرة (3 ـ 5 ثواني فقط).

3 . أغمر Flood لطخة البكتيريا المثبتة على الشريحة بمحلول Crystal Violet لمدة 60 ثانية، وبعد ذلك أبعد محلول الصبغة الزائدة Drain واغسل wash الشريحة ببطء ولمدة قصيرة بالماء.

4 . أغمر اللطخة بعد ذلك بصبغة اليود Gram's Iodine لمدة 60 ثانية وأبعد الصبغة الزائدة (هنا لا تغسل بالماء).

5 . إغسل اللطخة بمادة مزيلة للأصباغ Decolorizing agent في هذه الحالة استعمل 95 في المائة كحول إيثيلي Ethanol أو خليطاً بنسبة متساوية من كحول إيثيلي وأستون Ethanol/ Acetone، بعد ذلك اغسل فوراً المادة المزيلة للأصباغ من الشريحة بواسطة ماء الصنبور.

في حالة غمر Flooding اللطخة بالمادة المزيلة للأصباغ مثل الكحول الإيثيلي فإنه ينصح بعدم بقاء الكحول على اللطخة أكثر من 10 ثواني. بقاء الكحول أكثر من 10 ثواني ينتج عنه زوال أو إبعاد الصبغتين المتحدتين في مركب واحد Crystal Violet - Gram's Iodine complexes من البكتيريا الموجبة والبكتيريا السالبة مما يعتبر عدم دقة في طريقة الصبغ، كذلك مدة أقل من 10 ثوان تعتبر غير دقيقة.

● يجب عدم غسل الشريحة بعد إزالة صبغة اليود الزائدة حتى لا يتعرض الكحول الإيثيلي المضاف على الشريحة للتخفيف Dilution مما يعطي كذلك نتائج غير دقيقة.

● عند استعمال الكحول الإيثيلي بطريقة جيدة فإن الخلايا البكتيرية الموجبة لصبغة جرام سوف تتلون باللون الأزرق البنفسجي القاتم Dark Blue Violet والخلايا البكتيرية السالبة لصبغة جرام تظهر واضحة Clear وصعبة الرؤية.

6 . أغمر الشريحة بمحلول صبغة Safranin وهي عبارة عن صبغة مضادة Counter stain لمدة 20 ـ 30 ثانية، بعد ذلك إغسل الشريحة جيداً وببطء بالماء.

7 . جفف الشريحة بورق خاص Bibulous Paper أو مناديل ورقية Paper Towel.

8 . حدد اللطخة بمساعدة العدسة الشيئية الصغرى (× 10)، بعد ذلك أضف قطرة من الزيت Immersion oil على الشريحة وغيّر إلى العدسة الزيتية المنغمسة oil Immersion lens. حجاب المكثف يجب أن يكون مفتوحاً حتى تتحصل العدسة الزيتية على أكبر قدر من الضوء.

9 . أرسم واكتب ملاحظاتك عن ما ترى على الشريحة تحت المجهر.

تستطيع أن تقول بأنك أجريت صبغ البكتيريا بطريقة جرام بشكل صحيح إذا تلونت البكتيرية الموجبة **Staphylococcus, Bacillus** باللون الأزرق البنفسجي الداكن **Dark Blue violet** والبكتيريا السالبة **Escherichia, Neisseria** باللون الأحمر الفاتح Light Red.

تمرين (32):

صبغ حافظة البكتيريا **The Capsule Staining of Bacteria**

الحافظة البكتيرية Bacterial Capsule عبارة عن طبقة غليظة من متعدد السكريات Polysaccharide (بعض البكتيريا تحتوي على حافظة من متعدد الببتيدات Polypeptide). يبلغ غلظ الحافظة من 1 إلى 2 ميكرون Micron وتحيط بالخلية البكتيرية من الخارج. الحافظة في البكتيريا تقوم بوظيفتين هامتين، تساعد على التصاق البكتيريا بالأسطح المختلفة وتحمي البكتيريا من

خلايا الدم البيضاء White Blood Cells التي تقوم بعملية البلعمة Phagocytosis، ويوجد أيضاً متعدد السكريات Stringly Polysaccharide الذي يساعد على التصاق البكتيريا بالأسطح ومع بعضها ويسمى glycocalyx. عندما يصبح glycocalyx غليظاً جداً يصعب تفريقه من الحافظة.

بعض البكتيريا تملك القدرة على تسبب الأمراض لأنها تحتوي على حافظة، مثلاً البكتيريا **Streptococcus mutants** والتي تنتج حافظة تعتبر أحد أنواع البكتيريا التي تلعب دوراً كبيراً في تسبب مرض تسوس الأسنان Tooth Decay (caries)، لأن لها القدرة على الالتصاق بالأسنان. الأحماض Acids التي تنتجها البكتيريا أثناء عملية التخمر Fermentation للمواد السكرية المتواجدة بين الأسنان تؤدي إلى تكسير Degradation غلاف المينا Enamel Coating. البكتيريا **Streptococcus pneumoniae** (Pneumococcus)، والتي تسبب مرض التهاب الرئة الحاد Pneumonia، ممرضة جداً للإنسان لأنها تحتوي على حافظة. ويعتبر هذا النوع من البكتيريا الخالي من حافظة غير ممرض. عندما تدخل البكتيريا Pneumococcus المحتوية على حافظة إلى الرئتين يصعب التهامها عن طريق كرات الدم البيضاء Macrophages and Monocytes المتواجدة في الرئتين. في هذه الحالة يمكن للبكتيريا أن تسبب ضرراً للرئتين مما ينتج عنه مرض Pneumonia. من ناحية أخرى عندما تكون هذه البكتيريا بدون حافظة يسهل بلعمتها وتحليلها في الرئة. حوالي نصف عدد الناس العاديين (غير المرضى) يحملون هذه البكتيريا غير المحتوية على حافظة في الحلق Throat مما يدل على أن تسبب المرض يأتي من البكتيريا ذات الحافظة.

حافظات البكتيريا غليظة ويمكن رؤيتها بالمجهر الضوئي ولكن وحيث أنه يوجد صعوبة في صبغ هذه الحافظات فإنه يمكن ملاحظتها بواسطة طريقة الصبغ السالب Negative Staining. الخلفية أو المنطقة حول الخلية البكتيرية

Background تصبغ بصبغة حمضية Acidic stain بينما الخلية نفسها تصبغ بصبغة قلوية Basic stain ذات لون مختلف والحافظة تبقى بدون صبغ Unstained وتظهر على شكل منطقة شفافة ساطعة حول خلية البكتيريا.

المواد: Materials

ـ مزارع صغيرة العمر (أقل من 48 ساعة) للبكتيريا:

Klebsiella pneumoniae

Micrococcus Luteus

ـ الأوساط المغذية:

Nutrient Agar (NA)

Tryptic Soy Agar

ـ محاليل الأصباغ:

Modified Maneval's Stain, Congo Red

ـ شرائح مجهرية نظيفة Clean Microscopic Slides.

ـ مماسك للشرائح Clothespins.

ـ حلقات تلقيح Inoculating Loops

الطريقة: Procedure

1. ضع قطرة صغيرة من صبغة Congo Red على شريحة مجهرية نظيفة.

2. إخلط عينة صغيرة أو حلقة تلقيح مملوءة من بكتيريا **Klebsiella** مع قطرة Congo Red، تأكد من الخلط الجيد للبكتيريا مع الصبغة (شكل 44).

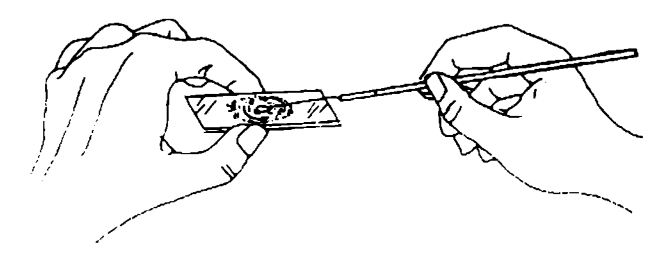
3 . أضف عينة صغيرة من البكتيريا الأخرى Micrococcus واخلطها لتحصل الآن على خليط Mixture لنوعين من البكتيريا. الآن عندك خليط من البكتيريا العصوية (Klebsiella) تحتوي على حافظة بينما البكتيريا الكروية **Micrococcus** ليس بها حافظة.

4 . باستعمال شريحة نظيفة أخرى وزع المحلول البكتيري المصبوغ على الشريحة بحيث تحصل على طبقة رقيقة من الخلايا المصبوغة (لطخة).

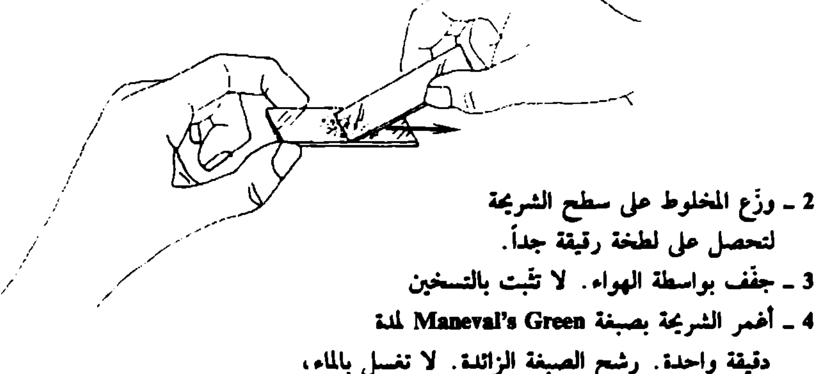
5 . جفف اللطخة الرقيقة على صفيحة ساخنة Hot Plate ولكن لا تثبتها بالحرارة Do Not Heat Fix.

ملاحظة:

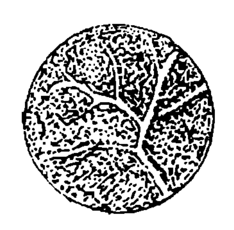
صبغة Congo Red تصبغ الخلفية Background، ولكن لا تصبغ الحافظة Capsule أو الخلية cell. صبغة Congo Red عبارة عن صبغة حمضية Acidic Stain (الجزء المسؤول عن اللون سالب الشحنة Negatively Charged)، ولهذا يصبح هناك تنافر بينه وبين الشحنات السالبة المتواجدة في غشاء وجدار وسيتوبلازم الخلية البكتيرية.

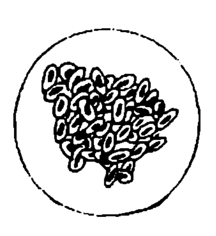


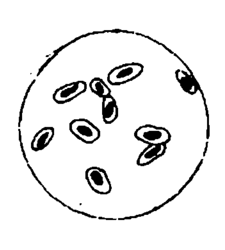
1 ـ إخلط حلقة مملوءة من المزرعة المراد صبغها مع عدة قطرات من صبغة Congo Red



2 ـ وزّع المخلوط على سطح الشريحة
لتحصل على لطخة رقيقة جداً.
3 ـ جفّف بواسطة الهواء. لا تثّبت بالتسخين
4 ـ أغمر الشريحة بصبغة Maneval's Green لمدة
دقيقة واحدة. رشح الصبغة الزائدة. لا تغسل بالماء،
وجففّ بورق التجفيف.







لطخة غليظة جداً — خلايا كثيرة متراكمة — لطخة (غشاء) جيدة

شكل (44). طريقة صبغ المحافظة.

6 . أغمر اللطخة الجافة بصبغة Modified Maneval وبعد مدة 60 ثانية أبعد الصبغة الزائدة Drain off (الصبغة لونها أحمر) وجفف باستعمال مناديل ورقية Towels or Bibulous Paper . لا تشطف بالماء Do Not Rinse with water .

7 . حدد موقع اللطخة تحت المجهر بالعدسة الصغرى (× 10) ثم ضع قطرة من الزيت Immersion Oil وغيّر للعدسة الزيتية Oil Immersion Objective . يجب أن يكون حجاب المكثف Condenser مفتوحاً حتى تصل أكبر كمية من الإضاءة إلى العدسة الشيئية.

ملاحظة :

صبغة Maneval تعتبر صبغة قلوية Basic stain وتلون البكتيريا باللون الأحمر لأنها ترتبط مع الشحنات السالبة على سطح البكتيريا، وبما أن كلا الصبغتين (Congo Red and Maneval) لا ترتبطان بالحافظة لذلك تبقى هذه الحافظة بدون لون Unstained وشفافة Translucent . تفاعل صبغة Congo Red مع صبغة Maneval يغير صبغة Congo Red من اللون الأحمر إلى اللون الأزرق Blue ولهذا تتلون الخلفية Background باللون الأزرق.

8 . صف وارسم واكتب البيانات على الرسم.

تمرين (33):

صبغ الأبواغ البكتيرية Staining of Bacterial Endospores

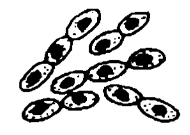
البوغ البكتيري Bacterial endospore عبارة عن تركيبة بكتيرية ساكنة resting endospore تنتجها بعض الأجناس البكتيرية في ظروف بيئية سيئة (شكل 45). الأجناس البكتيرية المعروفة بإنتاجها لهذه الأبواغ (الجراثيم) تشمل: **Bacillus, Clostridium, Thermoactinomyces, Sporolactobacillus,**

Sporosarcina, Desulfotomaculum وربما **Metabacterium**. والأبواغ البكتيرية تتكون داخل الخلية البكتيرية وبوغ واحد فقط يتكون داخل الخلية، لذلك لا يعتبر هذا النوع من التجرثم Sporulation طريقة للتكاثر Reproduction.

تحت الظروف الملائمة Favorable Conditions تتكاثر البكتيريا المكونة للأبواغ، مثل بقية البكتيريا العادية وذلك عن طريق الانقسام الثنائي البسيط binary fission. هذا النوع من النمو والتكاثر يسمى التكاثر الخضري Vegetative growth. ولكن عندما تصبح الظروف غير ملائمة (مثل نقص المواد المغذية) Unfavorable conditions البكتيريا المنتجة للابواغ تبدأ في التجرثم sporulation وكل خلية تكون بوغاً Endospore بداخلها. بعض من هذه الظروف غير الملائمة هي:



Bacillus anthracis
(بوغ خيزراني)



Bacillus cereus
(بوغ مركزي، لا يوجد إنتفاخ)



Clostridium tetani
(بوغ نهائي مع انتفاخ)

Clostridium perfringens
(بوغ مركزي مع إنتفاخ)

شكل (45). حجم وموقع بعض الأبواغ البكتيرية داخل الخلايا الخضرية.

1 . نقص الكربون أو الطاقة أو الكبريت.

2 . تزايد نسبة المواد السامة في الوسط Accumulation of toxic Wastes

3 . درجة الحرارة تصبح غير ملائمة.

4 . تغير في الضغط الأزموزي بسبب الجفاف، في ظروف المعمل التجرثم يحتاج إلى 15 ساعة، تعتبر الأبواغ مقاومة لدرجات الحرارة العالية والمواد الكيميائية التي تعتبر قاتلة للخلايا الخضرية. بعض الأبواغ مثل أبواغ البكتيريا: **Clostridium botulinum** لها القدرة على البقاء حية في ماء يغلي لعدة ساعات. الجفاف أو عدم توفر المواد الغذائية لا تؤثر على حيوية الأبواغ. أيضاً الأبواغ تقاوم الأشعة فوق البنفسجية UV light وغير حساسة للمضادات الحيوية Antibiotics التي تقتل الخلايا الخضرية.

عندما تتوفر الظروف المناسبة فإن الأبواغ تتحول Germinate إلى خلايا خضرية vegetative cells وهذه الخلايا بدورها تنمو وتتكاثر بالانقسام الثنائي البسيط Binary Fission. تحت الظروف المعملية Laboratory Conditions التغير إلى الخلية الخضرية لا يتطلب أكثر من ساعة لكي يصبح البوغ بعد ذلك حساساً للظروف الكيميائية والفيزيائية المختلفة، نظراً لأن الغلاف الخارجي outer coat للأبواغ يعتبر مانع للمواد الكيميائية Barrier to chemicals، لهذا فإن الأبواغ صعبة الصبغ ولكن باستعمال أصباغ ساخنة Hot dyes أمكن التغلب على هذه المشكلة. الحرارة تسبب تمدد الغلاف Coat وبذلك يسهل دخول الأصباغ إلى داخل الأبواغ.

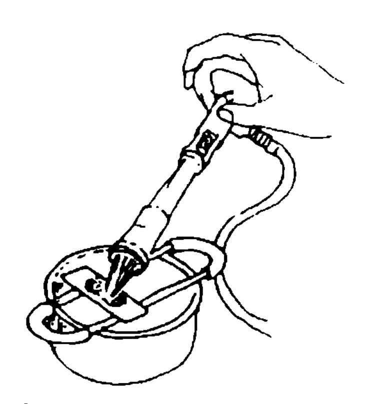
المواد: Materials

- مزارع طويلة العمر (أكثر من 48 ساعة) للبكتيريا: **Bacillus subtilis**
- محلول صبغة Malachite green (تسبب مرض السرطان).

- شرائح مجهرية نظيفة.
- مماسك ملابس.
- إبر زرع أو حقن.
- لهب.
- حوض ماء.

الطريقة: Procedure

1. حضر لطخة بكتيرية رقيقة من البكتيريا المذكورة أعلاه وجففها في الهواء وثبتها بالحرارة.
2. ضع الشريحة على حامل شرائح Rack على حوض الماء Sink.
3. اغمر اللطخة الجافة بصبغة Malachite green وسخن الصبغة حتى يخرج منها البخار (شكل 46). صبغة Malachite green يجب أن تتبخر لمدة لا تقل عن 5 دقائق.



شكل (46). طريقة تسخين صبغة Malachite green للكشف عن الأبواغ البكتيرية Endospores.

إحدى الطرق الجيدة للتبخر Steaming هي أن تسخن صبغة Malachite green من أعلى بواسطة اللهب لمدة 5 دقائق (شكل 46).

عندما تبدأ هذه الصبغة في التبخر أضف صبغة أكثر وسخن من جديد، عندما يخرج البخار توقف بعض الشيء عن التسخين حتى لا تنكسر الشريحة. طريقة أخرى هي التسخين لمدة خمس دقائق من أسفل عن طريق بخار ساخن يخرج من حمام ماء يغلي ولا ينصح بهذه الطريقة. بعض مدرسي المعامل ينصحون بطريقة أخرى وهي بأن يضع الطالب قطعة صغيرة من منديل الورق towel paper فوق اللطخة قبل إضافة صبغة Malachite green. هذه الطريقة تمنع التبخر الكامل للصبغة وجفافها على الشريحة قبل دخولها داخل الأبواغ. في أي من الحالات فإن التسخين يمدد غلاف الأبواغ ويسمح بدخول الصبغة Malachite green إلى الداخل وعندما يبرد البوغ Endospore فإن الصبغة تبقى في الداخل.

4 . أترك الشريحة تبرد لمدة دقيقة واحدة قبل الاستمرار في العمل.

5 . إذا استعملت قطعة ورق المناديل قبل الصبغ فإنه عليك بإبعادها وبعد ذلك إغسل الشريحة جيداً بماء الصنبور.

الماء يبعد صبغة Malachite green من أغلب الخلايا الخضرية ولكن لا يستطيع إبعاد الصبغة من داخل الأبواغ، في هذه الحالة تظهر الأبواغ خضراء اللون والخلايا واضحة Clear وصعبة الرؤية.

6 . ضع فوق اللطخة صبغة السفرانين Safranin وهي الصبغة المضادة Counterstain لمدة 60 ثانية. لا تسخن صبغة السفرانين.

7 . صبغة السفرانين عبارة عن صبغة قلوية Basic stain وترتبط بالشحنات السالبة Negative charges على سطح الخلية البكتيرية. هذه الصبغة لا تستطيع الدخول إلى داخل الأبواغ، هنا تتلون الخلايا باللون الأحمر وتظهر الأبواغ في حالة وجودها خضراء اللون.

8 . إغسل اللطخة بالماء وجفف بورق مناديل، لا تغسل طويلاً حتى لا تبعد

صبغة السفرانين (صبغة ضعيفة) من الخلايا الخضرية.

9 . حدد وجود اللطخة بالعدسة ذات القوة (× 10) ثم ضع قطرات من الزيت وغير إلى العدسة الزيتية (× 100) لفحص الخلايا. حجاب المكثف يجب أن يكون مفتوحاً حتى تدخل أكبر كمية من الضوء إلى العدسة الشيئية.

10 . صف وارسم ما ترى تحت المجهر.

تمرين (34):

صبغ البكتيريا المقاومة للأحماض The Acid - Fast Staining of Bacteria

تعتبر طريقة استعمال الصبغة المقاومة للأحماض Acid - Fast Staining مفيدة جداً للتفريق بين أجناس البكتيريا **Mycobacterium, Nocardia** وبقية الأجناس البكتيرية. هذان الجنسان من البكتيريا يحتويان على أنواع ممرضة وخطيرة للإنسان مثل النوع **Mycobacterium tuberculosis** المسببة لمرض السل أو الدرن Tuberculosis وكذلك النوع Mycobacterium leprae التي تسبب مرض الجذام Leprosy، البكتيريا Nocardia asteroides تسبب التهاباً رئوياً Pulmonary Nocardosis وهو مرض في الرئتين يشبه السل Tuberculosis.

هذه الأجناس من البكتيريا تعتبر مقاومة للأحماض Acid - Fast لأنها تحتفظ بصبغة أولية Primary Stain وهي صبغة Ziehl - Neelsen Carbol fuchsin التي تخرج من خلايا جميع أنواع البكتيريا الأخرى عند معاملتها لمدة قصيرة بمادة حمضية مزيلة للأصباغ Acidified decolorizing Agent وهي عبارة عن خليط من حمض وكحول Acid - Alcohol. البكتيريا المقاومة للأحماض تتلون باللون الأحمر الساطع Bright Red. البكتيريا التي تفقد الصبغة الأولية بعد معاملتها بخليط الحمض والكحول يقال عنها بأنها بكتيريا غير مقاومة للأحماض Non - Acid - Fast Bacteria. البكتيريا غير المقاومة للأحماض يمكن التعرف عليها عند استعمال الصبغة المضادة Methylene Blue التي تصبغ

البكتيريا باللون الأزرق الساطع. البكتيريا Mycobacterium و Nocardia تختلف عن بقية البكتيريا لأنها تحتوي على تركيز عالي من مادة شمعية Waxes في جدارها الخلوي Cell Wall. في بعض الأنواع تصل نسبة الشمع إلى 60 في المائة من وزن الجدار. هذه الشموع تجعل البكتيريا صعبة التلوين لأن أيونات الأصباغ Charged Dye Ions لا تنفذ من خلال الطبقات الشمعية للجدار Waxy layers of the wall. الصبغة الأولية تتخلل هذه الطبقة الشمعية بمساعدة الحرارة Heat. بعد دخول هذه الصبغة إلى داخل الخلية البكتيرية يصعب خروجها Decolorization بخليط من الحمض والكحول.

المواد: Materials

- مزارع صغيرة (أقل من 48 ساعة) للبكتيريا المقاومة للأحماض **Mycobacterium phlei M. smegmatis**.
- مزارع صغيرة (أقل من 48 ساعة) للبكتيريا غير المقاومة للأحماض **Bacillus subtilis, Escherichia coli, Staphylococcus epidermidis** أو غيرها من البكتيريا الغير مقاومة للأحماض.
- محاليل الأصباغ الآتية Ziehl - Neelsen Carbolfuchsin, Methylene Blue.
- محلول Acid - Alcohol.
- شرائح مجهرية نظيفة.
- حلقة تطعيم Inoculating loop.
- مماسك ملابس Clothspins.
- لهب Flame.
- حوض به ماء صنبور Sink with Tap water.

الطريقة : Procedure

1 . حضر لطخات (أغشية) smears مجففة هوائياً ومثبتة من المزارع البكتيرية المذكورة أعلاه. ربما ترغب في تحضير لطخة من نوعين من البكتيريا أحدهما مقاوم للأحماض والآخر غير مقاوم لترى التباين بين النوعين. نظراً لأن خلايا البكتيريا **Mycobacterium** شمعية جداً ويصعب خلطها بالماء، فربما تحتاج إلى بعض الوقت في تفريق هذه الخلايا عن بعضها بواسطة حلقات Loops أو إبرة Needle التلقيح. توزيعك للبكتيريا عن بعضها فوق الشريحة قبل عملية الصبغ يساعدك في التعرف على الخلايا المنفردة بعد الصبغ.

2 . ضع الشريحة على حامل Rack فوق حوض الماء Sink. يمكن استعمال مثبتات الملابس Clothspins لتثبيت الشريحة على الحامل.

3 . أغمر Flood اللطخة المثبتة بصبغة Carbolfuchsin وسخن الصبغة حتى تبدأ في التبخر (الشكل 47). هذه الصبغة يجب أن تتبخر لمدة 5 دقائق. من أجل جعل صبغة Carbolfuchsin تتبخر، سخن من أعلى باللهب Flame (شكل 47) وعندما تبدأ الصبغة في التبخر Evaporate أضف لامزيد منها على الشريحة. لا تسمح بغليان الصبغة. أيضاً أبعد اللهب بين الحين والآخر حتى لا تسخن الشريحة بشدة وتنكسر. يمكن إضافة قطعة صغيرة من منديل ورقي Paper Towel على اللطخة قبل إضافة الصبغة، هذا يحفظ الصبغة من التبخر السريع والجفاف فوق الشريحة. التسخين يذيب الشمع في جدار الخلايا ويسمح بدخول صبغة Carbolfuchsin. بعد التبريد يقفل الشمع من جديد وتبقى الصبغة بداخل الخلايا.

4 . إذا استعملت قطعة منديل الورق أبعدها واغسل الشريحة بالماء جيداً وجففها.

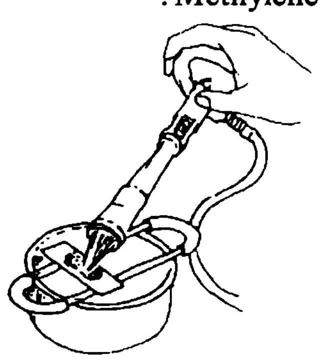
5 . أغمر Flood الشريحة بمحلول Acid - Alcohol لمدة 20 ثانية، ثم

اغسل فوراً الشريحة بالماء جيداً لإيقاف عملية إزالة الصبغة Decolorization.

محلول Acid - Alcohol يبعد صبغة Decolorization من الخلايا التي لا تملك شموع waxes في الجدار الخلوي ولكن لا يستطيع أن يبعد هذه الصبغة من الخلايا التي تحتوي على نسبة عالية من الشموع في الجدار الخلوي. حتى هذه الخطوة في عملية الصبغ نجد أن الخلايا الشمعية تظهر حمراء اللون، بينما الخلايا بدون شموع تكون واضحة clear وصعبة الرؤية تحت المجهر.

6 . اصبغ اللطخة بصبغة Methylene Blue وهي عبارة عن صبغة مضادة Counterstain لمدة 60 ثانية.

تعتبر صبغة Methylene Blue صبغة قلوية Basic Dye وترتبط مع الشحنات السالبة Negative charges على سطح الخلايا الخضرية Vegetative cells الخالية من الشموع Wax - free أي على سطح البكتيريا غير المقاومة للأحماض Non - Acid - fast Bacteria. من جهة أخرى Methylene Blue لا ترتبط أو تدخل الخلايا الشمعية، لهذا فإن الخلايا الشمعية تظهر حمراء Red لاحتوائها على صبغة Carbolfuchsin الحمراء والخلايا غير الشمعية زرقاء Blue لوجود الصبغة المضادة Methylene Blue.



شكل (47). تسخين صبغة الكربول فوكسين Carbolfuchsin أثناء طريقة Acid - fast Stain

7 . أبعد صبغة Methylene Blue الزائدة بالماء. هذه الصبغة ضعيفة weak Dye ويمكن إبعادها بسهولة. جفف بحذر بمنديل ورقي.

8 حدد موقع اللطخة المصبوغة عن طريق العدسة الصغرى (× 10) ثم ضع قطرة من الزيت على اللطخة وغير إلى العدسة الزيتية (× 100). حجاب المكثف يجب أن يكون مفتوحاً حتى يمكن دخول إضاءة كافية إلى العدسة الشيئية.

9 . إرسم ودون نتائجك حول ما ترى على الشريحة تحت المجهر.

الأسئلة:

1. لماذا نصبغ البكتيريا؟
2. لماذا نفضل صبغ البكتيريا بالأصباغ القلوية؟
3. ما المقصود بالصبغ البسيط للبكتيريا؟
4. لماذا يعتبر صبغ البكتيريا بطريقة جرام أحد أهم الخطوات في تعريف البكتيريا؟
5. ما وظيفة الحافظة Capsule في البكتيريا؟
6. ما المقصود بالصبغ السالب؟
7. لماذا تعتبر كثير من البكتيريا المحتوية على حافظة ممرضة جداً؟
8. هل تعتبر الحافظة ضرورية لحياة وتكاثر البكتيريا؟
9. ما هي المادة الكيميائية المكونة للحافظة؟
10. أذكر أربع أجناس من البكتيريا المنتجة للأبواغ؟
11. ما إسم الصبغة التي تستعمل في صبغ الأبواغ؟
12. لماذا تتحمل الأبواغ البكتيرية درجات حرارة عالية؟

13. ما المقصود بالصبغة المضادة Counterstain؟

14. لماذا تعتبر بكتيريا **Mycobacterium** مقاومة للأحماض ولا نستطيع صبغها بطريقة جرام؟

15. ما أهمية التعرف على هذه البكتيريا؟

16. لماذا استعملنا طريقة التسخين أثناء صبغ البكتيريا المقاومة للأحماض Acid - Fast Bacilli؟

إختبارات للمواد المخزنة داخل الميكروبات
Microchemical Tests for Reserve Materials

خلال مراحل معينة للنمو، بعض الميكروبات تكون حويصلات Deposits or Granula تخزن فيها بعض المركبات الكيميائية، هذه المركبات تعتبر احتياطية Reserve. من ضمن هذه المركبات أحد أنواع النشويات Polysaccharides، وهو مركب الجليكوجين Glycogen الذي وجد مخزناً في خلايا الخميرة yeast cells وفي بعض أنواع البكتيريا. هذا النشا شبيه بذلك المخزن في الخلايا الحيوانية لأنه يتلون باللون الأحمر عند معاملته بمحلول اليود.

هناك أيضاً مواد مخزنة تشبه الدهون Lipid - Like Deposits وأهمها هو Poly - β Hydroxybutyric Acid الذي اكتشف في كثير من أنواع البكتيريا بواسطة صبغة الدهن الذائب Fat - Soluble dye والتي تلون الطبقة الدهنية Lipid layer المحاطة بالدهن المخزن داخل الحويصلة Granula. صبغة Sudan Black B تعتبر من أهم هذه الصبغات.

بعض من أنواع البكتيريا تخزن عنصر الكبريت Granules of polymetaphosphate، هذه الحويصلات تسمى Volutin Granula أو Babes - Ernst Granula أو Metachromatic Granula.

المواد: Materials

- مزارع نقية من Saccharomyces cerevisiae, Bacillus cereus, Bacillus megaterium
- إبر زرع Inoculating Needles.
- محلول اليود Lugol's Iodine.
- غطاء شرائح Cover glass.
- شرائح مجهرية Slides.
- محلول الميثيلين الحمضي Acidified aqueous Methylene Blue
- صبغة أسود سودان Sudan Black B.

تمرين (35):

الكشف على النشا Glycogen:

1. باستعمال إبرة الزرع أنقل بعضاً من خلايا الخميرة **Saccharomyces cerevisiae** إلى قطرة من الماء على شريحة نظيفة واخلط الخلايا بحذر.
2. أضف قطرة من محلول اليود Lugol's Iodine واخلط من جديد.
3. ضع غطاء الشريحة على المستحضر Preparation وادرس خلايا الخميرة تحت العدسة الزيتية.
4. عند عمل هذا الاختبار يجب أن تكون المزرعة حمضية Acidic. إذا كانت قلوية يجب عليك أن تجعلها حمضية قبل إضافة محلول اليود.

بعض البكتيريا ـ خاصة مجموعة من البكتيريا اللاهوائية المنتجة للأبواغ ـ تحتوي على نوع آخر من النشا المخزن يسمى iogen أو Granulose وهو يتلون باللون الأزرق عند إضافة محلول اليود.

تمرين (36):

الكشف على الدهن Poly - β- Hydroxybutyric Acid

1 . أنقل بعضاً من خلايا البكتيريا **Bacillus megaterium** إلى قطرة من الماء على شريحة نظيفة واخلط جيداً.

2 . أضف قطرة من محلول صبغة Sudan Black B واخلط جيداً.

3 . ضع غطاء الشريحة على المستحضر وادرسه تحت العدسة الزيتية.

ملاحظة:

نظراً لأن الخلايا لا تتلون ولكن الغشاء حول مركب الدهن المخزن يتلون يجب عليك تقليل كمية الضوء من أجل زيادة التغاير أو التباين Contrast.

تمرين (37):

الكشف على الكبريت Volutin Granula:

1 . حضر لطخة Smear للبكتيريا **Bacillus cereus** واتركها لتجف وثبتها بالحرارة.

2 . أضف قطرة من محلول الميثلين الحمضي.

3 . ضع غطاء الشريحة على المستحضر وادرسه تحت العدسة الزيتية.

4 . الحويصلات تتلون باللون الأزرق الداكن بينما السيتوبلازم باللون الأزرق الباهت.

أسئلة:

1 . أذكر بعض المركبات الكيميائية التي تخزنها بعض البكتيريا.

2 . ما فائدة الكشف على هذه المركبات في أنواع معينة من البكتيريا؟

الباب الرابع

بعض التفاعلات الفيزيولوجية للبكتيريا

Selected Physiological Reactions of Bacteria

إنتاج الأنزيمات الخارجية لتحليل الجزيئات الكبيرة:

Production of Exoenzymes

تختلف البكتيريا عن بعضها في كثير من الأشياء مثل أشكالها الخارجية Shape، وأشكال مستعمراتها Colonial Morphology، إنتاجها للصبغات Pigment Production، قابليتها للصبغ Staining Properties، وإنتاجها لتركيبات خاصة مثل الأبواغ Endospore والحافظات Capsules. في هذا التمرين سوف نتعلم بأن البكتيريا تختلف كثيراً في مقدرتها على استعمال المواد المغذية Nutrients ونواتج تحليلها لهذه المواد، حيث يعتمد هذا على أنواع الأنزيمات (الخمائر) التي تنتجها. إنتاج هذه الأنزيمات يعتمد على الاختلافات في العامل الوراثي Genetic Differences.

كل أنواع البكتيريا تحتوي على أنزيمات داخلية Endoenzymes والتي تعمل داخل الخلية. بعض الاختلافات في نظم هذه الأنزيمات ينتج عنها نواتج أيضية مختلفة. بعض أنواع البكتيريا تنتج أيضاً أنزيمات خارجية Exoenzymes وهي أنزيمات تنتج داخل الخلية وتفرز في الوسط الخارجي لتؤدي وظيفتها خارج الخلية (شكل 48). أغلب ولكن ليس كل الأنزيمات الخارجية تعتبر

محللة Hydrolytic أي لها القدرة على تحليل أو تكسير Degradation الجزيئات الكبيرة Macromolecules إلى أخرى صغيرة Small Molecules. هذه الجزيئات الصغيرة تستطيع النفاذ خلال غشاء الخلية ليأتي دور الأنزيمات الداخلية في تحليل هذه الجزيئات الصغيرة واستفادة الخلية منها.

في هذا التمرين نتعرف على بعض هذه الأنزيمات الخارجية المحللة والتي تلعب دوراً كبيراً في التعريف بأنواع كثيرة من البكتيريا.

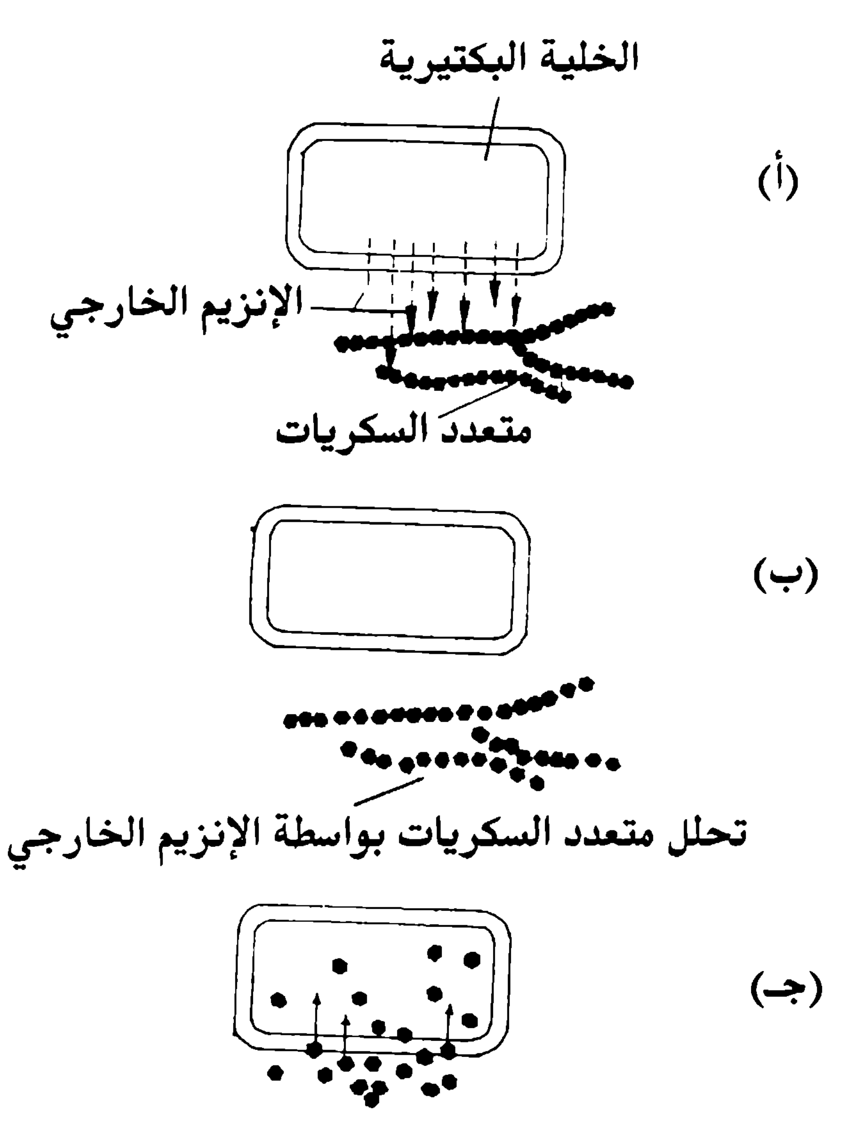
الأنواع الثلاث الرئيسية للمجموعات الغذائية Food Groups التي تحللها البكتيريا والفطريات هي النشويات Carbohydrates (Starch)، البروتينات Proteins والدهون Fats.

تمرين (38):

تحلّل النشا Starch Hydrolysis

المواد: Materials

- صحن يحتوي على أجار النشا المعقم Sterile starch Agar Plate.
- صبغة يود جرام مخففة 1 : 1 (10 مل) Gram's Iodine.



شكل (48). طريقة عمل الإنزيمات الخارجية Exoenzymes في تكسير الجزيئات الكبيرة Macromolecules.

ـ مزارع مائلة Slant Culture للبكتيريا E. coli و B. Subtilis

الطريقة : Procedure

هذا التمرين عبارة عن تظاهرة لاختفاء المادة النشوية المعقدة Complex Carbohydrate بسبب تأثير أو عمل الإنزيم المحلل والمعروف في هذه الحالة باسم أميليز Amylase. هذا الإنزيم يحلل النشا Starch إلى سكريات ثنائية Disaccharides وبعض السكريات الأحادية Monosaccharides مثل الجلوكوز Glucose. السكريات الثنائية والأحادية صغيرة بحيث تستطيع النفاذ خلال غشاء الخلية النصف نفاذي Semipermeable وتدخل إلى سيتوبلازم الخلية.

1. إزرع بواسطة عمل خط بالإبرة كما في الشكل (49) وذلك من البكتيريا B. subtilis, E. coli على سطح صحن أجار النشا المعقم.
2. ضع الصحن في الحاضنة لمدة 48 ساعة ودرجة حرارة 37 مئوية. بعد التحضين وفي حالة إنتاج الأنزيم الخارجي أو Amylase من أي من هذه البكتيريا فإن الإنزيم سوف ينتشر Diffuse في الوسط Medium حول المستعمرات البكتيرية.
3. أغمر سطح الصحن بطبقة رقيقة من محلول اليود Iodine، ولاحظ تغيير لون الوسط. اليود يعطي لوناً أزرق للوسط. في حالة عدم تحلل النشا في الوسط فإن النشا يتفاعل مع اليود ويتلون باللون الأزرق، أما في حالة تحلل النشا فلا يظهر هذا اللون الأزرق.
4. ارسم الصحن واكتب ملاحظات عن ظهور اللون الأزرق من عدم ظهوره.

تمرين (39):

تحلل بروتين الجيلاتين Hydrolysis of Gelatin Protein

الأنزيم Gelatinase يحلل البروتين Gelatin وذلك بتحويله إلى مادة

سائلة. هذا الأنزيم يحول الجيلاتين فقط إلى مادة سائلة بدون أن يختفي الجيلاتين.

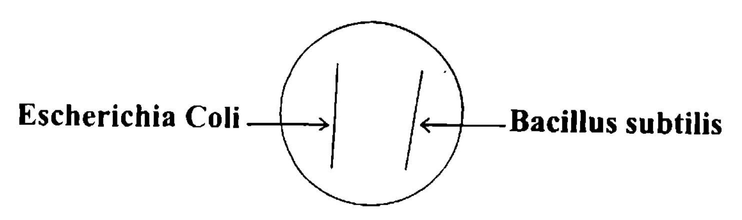
المواد: Materials

- أنابيب تحتوي على 7 مل جيلاتين مغذي (عدد 2) Nutrient Gelatin Stabs

- مزارع مائلة للبكتيريا: **E. coli Pseudomonas aeruginosa**

الطريقة: Procedure

1. إزرع بطريقة الحقن stab inoculations أنبوبتي الجيلاتين المغذي بالبكتيريا المذكورة أعلاه. الزرع بطريقة الحقن يتم بأخذ عينة من المستعمرة البكتيرية في المزرعة المائلة بواسطة إبرة الزرع Needle وإدخال الإبرة في مركز عمود الجيلاتين في الأنبوبة إلى أن تصل إلى قاع الأنبوبة وسحب الإبرة من نفس خط الحقن.



صحن يحتوي على أجار النشا المعقم

شكل (49). الزرع بواسطة خط واحد في طريقة تحليل النشا.

2. بعد الزرع ضع أنبوبتي الجيلاتين في الحاضنة في درجة 37 مئوية لمدة 48 ساعة أو أكثر والتي ربما تستغرق أسبوعاً أو أكثر. درجة الحرار 37 مئوية أو حتى درجة الغرفة يمكن أن تسبب في تحويل الجيلاتين إلى مادة سائلة، لهذا وللتأكد من أن سيولة الجيلاتين سببها التحلل بواسطة أنزيم الجيلاتينيز يجب وضع الأنابيب بعد التحضين في الثلاجة. إذا بقي الجيلاتين على حالة سائلة بعد وضعه في الثلاجة لمدة عشر دقائق فإن

هذا يعني بأن الجيلاتين قد تحلل بواسطة الأنزيم الذي أفرزته البكتيريا. أما إذا تصلب الجيلاتين بعد تبريده فهذا يعني أن درجة حرارة الحاضنة أو الغرفة هي التي تسببت في تحويله إلى مادة سائلة وليس الأنزيم.

ملاحظة هامة: يجب عدم هز الأنابيب عند نقلها من الحاضنة إلى الثلاجة ثم إلى طاولة العمل. الاهتزاز يسبب خلط الجيلاتين المتحلل مع الجيلاتين غير المتحلل مما ينتج عنه تركيبة تتصلب في ما بعد.

3 . أكتب نتائج تحليل الجيلاتين بواسطة البكتيريا مختصراً النتيجة بالسالب أو الموجب.

تمرين (40):

تحلل المواد الدهنية: Fat Hydrolysis

بعض الكائنات الدقيقة تستطيع تحليل الدهون إلى Glycerol وأحماض دهنية Fatty Acids . صحون بتري المحتوية على Tributyrin Agar يختفي بها هذا الدهن عند نمو البكتيريا عليها والتي تفرز أنزيم ليبيز Lipase . هذا الأنزيم الخارجي Exoenzyme يحلل الدهن إلى المركبات المذكورة أعلاه. الأجار المحتوي على الدهن Tributyrin يكون غير شفاف وهو عبارة عن مستحلب Emulsion من الدهن والأجار. منطقة واضحة Clear Zone حول المستعمرة البكتيرية يدل على عملية تحلل الدهن Lipolysis ، وهذا يعتبر تحللاً للدهن مائياً Fat hydrolysis

المواد: Materials

- صحن يحتوي على أجار الدهن Sterile Tributyrin Agar
- مزارع مائلة من: E. coli, P. aeruginosa

الطريقة: Procedure

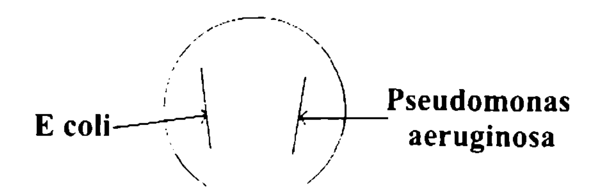
1. إزرع بعمل خط واحد بالإبرة (شكل 50) كل من E. coli, p. aeruginosa على صحن بتري المحتوي على Tributyrin Agar .

2. ضع في الحاضنة في درجة 37 مئوية لمدة 48 ساعة وافحصه بعد ذلك لمعرفة إذا ما كان هناك نشاط بكتيري لتحليل الدهن Lipolysis، ثم اكتب نتائج التمرين بالموجب أو السالب.

تمرين (41):

تحلل اليوريا: Urea Hydrolysis

هذا الاختبار مهم جداً في التفريق بين جنس **Proteus** والبكتيريا العصوية السالبة لصبغة جرام والتي تعيش في الأمعاء وخاصة المسببة منها للأمراض. بكتيريا Proteus تشبه أغلب البكتيريا الممرضة Pathogenic في الأمعاء مثل **Shigella** و **Salmonella** في كونها لا تستطيع تخمير سكر Lactose. الأوساط المغذية Media التي تستعمل في المعامل لأجل تعريف Identification البكتيريا الممرضة في الجهاز الهضمي تحتوي على سكر اللاكتوز. البكتيريا غير الممرضة Non pathogenic التي تعتبر من ضمن البكتيريا المتواجدة طبيعياً في الأمعاء Normal Flora تخمر هذا السكر ويمكن تفريقها من البكتيريا الممرضة مثل **Shigella** و **Salmonella**. حيث إن **Proteus** تعتبر غير ممرضة في الأمعاء فمن السهل تشخيصها خطأ والخلط بينها وبين البكتيريا الممرضة.



صحن يحتوي على دهن Tributyrin المعقم

شكل (50). الزرع بواسطة خط واحد في طريقة تحليل المواد الدهنية.

بكتيريا **Proteus** عندما تتواجد في الأمعاء تعتبر غير ممرضة ولكن عند دخولها إلى الجهاز البولي Urinary Tract فإنها تسبب التهاب المثانة البولية

الحاد Severe Cystitis وأمراضاً أخرى في الجهاز البولي. كذلك عزلت هذه البكتيريا من حالات مرضية أخرى مثل التهاب الأذن الوسطى Otitis Media، إلتهاب الصفاق Peritonitis وجروح الغنغرينا Gangranous Wounds.

هذا التمرين أو الاختبار من أجل التفريق بين البكتيريا **Proteus** والبكتيريا الأخرى التي لا تخمر سكر اللاكتوز Lactose وهو تحلل اليوريا. بكتيريا **Proteus** تنتج أنزيم Urease الذي يحلل اليوريا Urea إلى أمونيا Ammonia وثاني أكسيد الكربون CO_2.

$$\underset{\text{Urea}}{O = C\begin{cases} NH_2 \\ NH_2 \end{cases}} + H_2O \xrightarrow[\text{Urease}]{\text{Proteus}} \underset{\text{Ammonia}}{2NH_3} + CO_2$$

الطريقة: Procedure

- أقراص اختبار أنزيم اليوريز Urease Test Tablet
- مزارع الحساء المغذي للبكتيريا **Proteus vulgaris** و **E. coli**.
- أنابيب اختبار نظيفة بغطاء عدد (3).
- أنبوبة اختبار محتوية على حساء مغذ معقم.
- إبرة زرع.

الطريقة: Procedure

1. باستعمال الماصة أنقل 1 مل من كل مزرعة حساء إلى أنبوبة اختبار منفصلة ثم انقل 1 مل من الحساء المغذي المعقم إلى أنبوبة ثالثة.
2. ضع قرص اختبار أنزيم Urease في كل أنبوبة من الأنابيب الثلاثة. الأنبوبة الثالثة لا تحتوي على بكتيريا وتعتبر كشاهد Control.

3 . ضع الأنابيب الثلاثة في الحاضنة عند درجة 37 مئوية لمدة 2 ـ 4 ساعات.

ليس من الضروري استعمال أنابيب معقمة إذا كان بإمكانك اختبار الأنابيب خلال 2 ـ 4 ساعات نظراً لأن كمية اللقاح Inoculum من البكتيريا تكون غزيرة وتسود في الأنبوبة. أما إذا كان ليس باستطاعتك دراسة النتائج في هذا الوقت القصير فيجب عليك استعمال أنابيب معقمة.

في هذا الاختبار السريع لتحليل اليوريا مائياً Urea Hydrolysis ظهور لون أحمر كرزي أو أحمر زاه Cerise color يدل على قدرة البكتيريا على إنتاج أنزيم Urease وتحليل اليوريا، أما إذا بقي اللون أصفراً إلى قرنفلي Yellow to salmon color فإن الاختبار سالب والبكتيريا لم تنتج أنزيم Urease.

تنبيه: Precausion إذا استعملت لقاحاً ليس من مزرعة الحساء المغذي Broth culture فيجب أن تكون مدة الحضانة لإنتاج Urease أطول.

تمرين (42):

تخمر المواد الكربوهيدراتية Carbohydrate Fermentation

أهم المعايير في تعريف البكتيريا هي فروقها الفيزيولوجية. هذه الفروق الفيزيولوجية في البكتيريا تتجلى في المواد المغذية Nutrients التي تستطيع استخدامها والنواتج النهائية التي تنتج من التفاعلات الأيضية لهذه المواد المغذية. كل هذا يعتمد على الأنزيمات Enzymes التي تنتجها البكتيريا وهذا في النهاية يعتمد على الشفرة الوراثية genetic code للخلية البكتيرية.

ليس كل البكتيريا تنتج نفس الأنزيمات، لذلك تختلف البكتيريا في تحليلها للمواد ونواتج هذه المواد. فمثلاً بعض البكتيريا تنتج أنزيم Gelatinase بينما ميكروبات أخرى لا تنتج هذا الأنزيم ولكن تنتج أنزيماً آخر مثل Lipase. هذا يسهل لعلماء الميكروبات تعريف الأنواع المتقاربة من هذه الميكروبات.

أغلب البكتيريا تشبه إلى حد كبير خلايا أنسجة الإنسان في كونها تستعمل كثيراً من الكربوهيدرات كمصدر رئيسي للطاقة. المواد الكربوهيدراتية المستعملة في هذا التمرين تكون صغيرة بحيث تدخل إلى داخل الخلية البكتيرية وتستعملها البكتيريا كمصدر للطاقة بعد إجراء تغيير عليها وتحويلها إلى نواتج نهائية Endproducts.

المواد: Materials

ـ أنابيب تخمر معقمة Sterile Fermentation tubes تحتوي على:

1. حساء الجلوكوز Glucose (Dextrose) Broth (عدد 5).

2. حساء اللاكتوز Lactose Broth (عدد 5).

3. حساء السكروز Sucrose Broth (عدد 5).

4. مزارع مائلة للبكتيريا: **P. vulgaris, S. aureus, P. aeruginosa, E. coli**

الطريقة: Procedure

قبل أن تبدأ في إجراء التمرين يجب عليك معرفة ما تحتويه أنبوبة التخمر Fermentation tube. أنبوبة التخمر عبارة عن أنبوبة مزرعة Culture Tube حيث أنها تحتوي على الآتي:

1. أنبوبة صغيرة تسمى Durham Tube توضع في أنبوبة المزرعة بحيث تكون مقلوبة. الغرض من هذه الأنبوبة الصغيرة المقلوبة هو تجميع الغاز في حالة إنتاجه أثناء عملية التخمر. أغلب الغازات التي تنتج أثناء تفاعلات التخمر هي الهيدروجين Hydrogen، ثاني أكسيد الكربون CO_2 والميثان Methane.

2. الوسط المغذي المحتوي على صبغة الفينول Phenol Red Broth Base. صبغة الفينول تعتبر مؤشراً للأس الهيدروجيني pH Indicator. بعد تعقيم الوسط وقبل زراعته بالبكتيريا يكون التركيز الأيوني

للهيدروجين أو الأس الهيدروجيني به قرب المتعادل Near Neutral ويكون لون الوسط أحمراً Red ويتغير إلى اللون الأصفر Yellow عندما يكون هناك إنتاج للأحماض العضوية Organic Acids أثناء عمليات التخمر.

3. الكربوهيدرات Specific Carbohydrate مثل الجلوكوز Glucose، الملتوز Maltose اللاكتوز Lactose . . . إلخ. هذه المادة تخمرها البكتيريا وتنتج عنها حامض أو حامض وغاز. بعض البكتيريا تنتج خليطاً من الأحماض والغازات من تخمير سكر واحد Mixed Acid Fermentation (شكل 51). عند إجراء هذا التمرين إتبع الخطوات التالية:

1. باستعمال أنواع البكتيريا المذكورة أعلاه (أنظر المواد) إحقن أو ازرع ثلاث أنابيب تخمر تحتوي على كربوهيدرات أو سكريات معينة مع مراعاة ترك الأنبوبة الرابعة بدون زرع كشاهد Control.
2. ضع كل الأنابيب (12 أنبوبة) في الحاضنة في درجة حرارة 37 مئوية لمدة 48 ساعة.
3. إعمل جدولاً يحتوي على البيانات ولكتابة النتائج (جدول 5):

جدول (5) نتائج تمرين تخمر الكربوهيدرات.

Organism	Glucose	Lactose	Sucrose
E. coli			
P. vulgaris			
S. aureus			
P. aeruginosa			
Control			

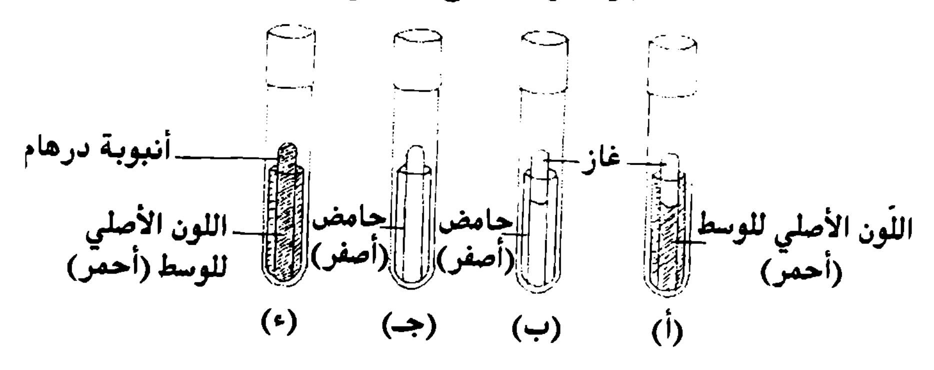
ترصد النتائج كالآتي:

AG = Acid and Gas حامض وغاز، أي الحساء أصفر وغاز في أنبوبة درهام.

A = Acid حامض فقط، أي الحساء يتغير إلى اللون الأصفر.

V = Variable. نتيجة غير ثابتة، يمكن أن تكون غاز أو غاز وحامض أو سالب.

ـ = Negative لا تغيير. الوسط يبقى كما هو.



شكل (51). أنماط من تخمر الكربوهيدرات بواسطة بعض الميكروبات.
(أ) التخمر الالكحولي Alcoholic Fermentation
(ب) نوع من تخمر مع إنتاج عدة أحماض Mixed Acid Fermentation
(جـ) تخمر مع إنتاج حامض الحليب Lactic Acid Fermentation
(د) أنبوبة غير محقونة كشاهد Control

تمرين (43):

إختزال النترات Nitrate Reduction:

أحد الصفات الفيزيولوجية لكثير من الميكروبات هي القدرة على اختزال جزيئات أو مركبات معينة. في هذا التمرين ندرس قدرة بعض البكتيريا في إنتاج الأنزيمات Nitrate Reductase أو Nitrite Reductase أو الاثنين. هناك

ميكروبات معينة فقط تستطيع اختزال النترات Nitrate إلى نتريت Nitrite. ميكروبات أخرى لا تستطيع بتاتاً اختزال النترات وميكروبات أخرى ليس فقط تختزل النترات إلى نتريت ولكن أيضاً تستطيع اختزال النتريت إلى أمونيا Ammonia أو غاز النتروجين N_2. يعتبر اختزال النترات إحدى الوسائل الهامة في تعريف البكتيريا في مختلف المعامل. الاختزال هو إضافة الهيدروجين والإلكترونات إلى الجزيء أو إبعاد الأكسجين منه.

إختزال النترات إلى نتريت يمكن الكشف عنه باختبار وجود النتريت بعد نمو البكتيريا في حساء Broth يحتوي على نترات البوتاسيوم KNO_3 أو ما يعرف بحساء النترات والحصول على إحدى النتائج الآتية، حيث يعتمد على نوع الأنزيمات التي ينتجها الميكروب:

1. عدم تغيير النترات.
2. إختزال النترات إلى نتريت.
3. إختزال النترات بسرعة إلى نتريت ثم إلى أمونيا أو غاز النتروجين.

من المتوقع الحصول على النتيجة رقم (2) وهي اختزال النترات إلى نتريت ويتوقف الاستمرار في الاختبار ويكون الاختبار هنا موجباً Positive. عند الحصول على نتيجة سالبة Negative يجب الاستمرار في الاختبار للحصول على النتيجة رقم (1) أو رقم (3).

المواد: Materials

1. مزارع مائلة للبكتيريا **Pseudomonas, Corynebacterium xerosis, E.coli, aeruginosa**.
2. أنابيب اختبار تحتوي على 5 مل من حساء النترات Nitrate Broth (عدد 4).
3. Sulfanilic acid في زجاجة تقطير Barnes Dropper.

4. alpha - Naphthylamine في زجاجة تقطير.

5. مسحوق الزنك (الخارصين) Powdered zinc.

6. عيدان أسنان مسطحة Flat Toothpick لخلط مسحوق الزنك.

الطريقة: Procedure

1. إحقن (إزرع) الثلاث أنابيب المحتوية على حساء النترات، كل أنبوبة بأحد أنواع البكتيريا المذكورة أعلاه. إستعمل الأنبوبة الرابعة كشاهد control للمقارنة ولا تزرع فيها أي بكتيريا.

2. ضع الأنابيب الأربعة في درجة 37 مئوية لمدة 48 ساعة.

3. بعد التحضين Incubation إختبر وجود النتريت Nitrite بإضافة قطرة من حامض Sulfanilic acid وإضافة قطرة من Naphthylamine لكل أنبوبة من الأنابيب الأربعة.

4. لا ترج المزارع نظراً لأن دخول الأكسجين إلى المزارع يعرقل الاختزال.

5. إذا كان الاختبار موجباً يظهر لون أحمر Red color مما يدل على اختزال النترات إلى نتريت ($NO_3 \rightarrow NO_2$) أما إذا كان الاختبار سالباً (لم يظهر اللون الأحمر)، أضف كمية قليلة من مسحوق الزنك (الخارصين) zinc باستعمال العيدان المسطحة. الخارصين يختزل النترات NO_3 إلى نتريت NO_2 ولهذا عندما يظهر اللون الأحمر فهذا يعني بأن النترات لم تتغير عن طريق نمو البكتيريا. اللون الأحمر ما زال يعني اختباراً موجباً للنتريت NO_2 ولكن الاختزال ($NO_3 \rightarrow NO_2$) أصبح كيميائياً بواسطة الخارصين. هذا لا يمكن أن يحدث عندما لا يكون هناك نترات NO_3 في الحساء Broth في تركيبتها الأصلية وهي نترات البوتاسيوم KNO_3 لهذا فإن البكتيريا لم تغير النترات NO_3.

مسحوق الزنك (الخارصين)

عندما لا يظهر لون أحمر بعد إضافة الخارصين فإن ذلك يدل على أن البكتيريا اختزلت النترات إلى نيتريت ثم إلى أمونيا أو غاز النيتروجين.

ملاحظة: تذكر دائماً بأن جميع الاختبارات يجب أن تقارن بالشاهد control وهي أنبوبة تحتوي على حساء النترات بدون زرع بكتيريا uninoculated، وهذا يعني بأنه يجب عليك معاملة أنبوبة الشاهد control Tube بنفس الطريقة التي تعامل بها الأنابيب الأخرى المزروعة inoculated. دوّن نتائجك في جدول.

تمرين (44):

إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين Hydrogen Sulfide Production

يوجد كثير من الأوساط Media التي يمكن استعمالها لاختبار قدرة نوع معين من البكتيريا على إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S هذه الأوساط تشمل Pepton iron Agar (PIA), Kligler Iron Agar (KIA), SIM Agar, Lead Acetate Agar (LAA) وكذلك triple Sugar Iron Agar (TSI Agar). أغلب هذه الأوساط تستعمل لاختبار إنتاج H_2S بالإضافة إلى بعض التفاعلات الأخرى الهامة في تعريف البكتيريا.

في هذا التمرين نستعمل PIA لتعيين فقط إنتاج H_2S عن طريق الكائنات الحية الدقيقة. ربما تكون على علم برائحة البيض المتعفن وهي رائحة كبريتيد الهيدروجين H_2S. كثير من أنواع البكتيريا تملك القدرة على إنتاج الأنزيمات اللازمة لإخراج H_2S كغاز من المركبات العضوية على الكبريت Sulfur. عندما يخرج H_2S يتحد مع الحديد iron الموجود في الوسط PIA ليكون

كبريتيد الحديد iron Sulfide. كبريتيد الحديد يظهر على شكل ترسبات سوداء Black Precipitate في الوسط. هذا التمرين يعتبر كذلك إحدى الوسائل المستعملة في تعريف البكتيريا.

تنبيه: عند استعمال البكتيريا **Salmonella typhimurium** يجب أن تكون خطوات عملك تحت تطهير كامل Aseptic Technique، نظراً لأن هذه البكتيريا ممرضة جداً Potential pathogenic وتسبب التهاب الجهاز الهضمي Gastroenteritis.

المواد: Materials

- مزارع تحتوي على الأجار المائل للبكتيريا: **Salmonella typhimurium proteus vulgaris, Escherichia coli**.
- أنابيب اختبار تحتوي على 7 مل من الوسط PIA المعقم (عدد 4).
- إبرة زرع Inoculating Needle.

الطريقة: Procedure

1. باستعمال إبرة الحقن أو الزرع إحقن Stab Inoculation ثلاث أنابيب محتوية على PIA كل أنبوبة بأحد الأنواع البكتيرية المذكورة أعلاه، ولا تحقن الأنبوبة الرابعة واستعملها كشاهد Control.
2. ضع الأنابيب الأربعة في الحاضنة على درجة حرارة 37 مئوية لمدة 48 ساعة.
3. بعد انتهاء مدة التحضين Incubation أكتب نتائج التمرين في جدول كالآتي (جدول 6):

جدول (6). نتائج تمرين إنتاج H_2S في البكتيريا.

Stab Culture	H_2S Production
E.coli	
P. vulgaris	
S.typhimurium	
Control	

استعمل التعبير موجب (+) أو سالب (–) عند ملأ الفراغات.

إختبارات إمفيك The IMVIC Tests

إختبارات إمفيك تضم أربعة اختبارات مختلفة وهي: إنتاج الإندول Indole Production، إختبار أحمر المثيل The methyl Red Test، إختبار فوقس بروسكاور The Voges - Proskauer Test، وأخيراً اختبار استعمال السيتريت The Citrate Utilization Test. والكلمة IMViC هي عبارة عن اختصار لأسماء هذه الاختبارات مع المراعاة بأن حرف (i) أضيف لتسهيل نطق الكلمة.

هذه الاختبارات الأربع وضعت لمعرفة بعض الصفات الفيزيولوجية للكائنات الحية الدقيقة وخاصة منها التي تساعد في تشخيص بكتيريا الأمعاء العصوية والسالبة لصبغة جرام. Gram - neg Coliform Bacteria مثل بكتيريا القولون **E. coli** ومجموعة **Enterobacter - Klebsiella**.

المواد: Materials

– مزارع في الحساء المغذي Nutrient Broth للبكتيريا الآتية:

1. **Escherichia coli**
2. **Enterobacter cloacae**

هذه المزارع تستعمل في كل تمرين من التمارين الأربع. أما المواد الأخرى المستعملة لكل تمرين فهي كالآتي:

(1): إنتاج الإندول Indole Production

- حساء تربتون معقم Sterile Tryptone Broth
- أنابيب اختبار عدد (3) Test tubes
- كاشف كوفاك Kovac's Reagent for Indole
- قنينة تقطير Dropper Bottle

(2): إختبار أحمر المثيل Methyl Red Test

- وسط معقم Sterile MR - VP Medium
- أنابيب اختبار (3) Test tubes
- مؤشر الآس الهيدروجيني Methyl Red pH Indicator
- قنينة تقطير Dropper Bottle
- أنابيب اختبار نظيفة بالغطاء (عدد 2). Clean Empty Tubes with Capalls

(3): إختبار فوقس بروسكاور Voges - Proskauer Test

- أنابيب اختبار نظيفة بالغطاء (عدد 2) Clean Empty Test Tubes With Capalls
- ماصتان حجم 5 أو 10 مل بها قطن Clean Cotton - plugged pipets
- مادة البوريت Buritt's Reagents
- قنينات تقطير Dropper Bottles (1 set)
- محلول أ: 5% Alpha Naphthol, Alcoholic

ـ محلول ب : Potassium Hydroxide - Creatinine

(4) : إستعمال السيتريت Citrate Utilization

أنابيب أجار مائل تحتوي على سيتريت Sterile Simmon's Citrate Agar Slants

الطريقة : Procedure

تمرين (45):

إنتاج الإندول Indole Production

1. بحذر وتجنباً للتلوث Aseptically بميكروب خارجي إحقن مقدار حلقة زرع Loopful من البكتيريا **E. coli, E. cloacae** في كل أنبوبة تحتوي على الوسط Tryptone Broth. أترك الأنبوبة الثالثة كشاهد Control.
2. تأكد من تمييز Labeling كل أنبوبة بكتابة إسم البكتيريا، نوع الوسط، رقم التمرين، إسمك... إلخ.
3. ضع الأنابيب الثلاثة في الحاضنة في درجة 37 مئوية لمدة 48 ساعة. في لقاء المعمل القادم سوف تضيف الكاشف أو المفاعل Reagent وتحصل على النتائج.
4. بعد 48 ساعة من التحضين Incubation، إختبر كل أنبوبة على وجود الإندول Indole وذلك باتباع الآتي:

أضف قطرة (dropperful) من مفاعل كوفاك Kovac's Reagent لكل مزرعة وهز الأنبوبة ببطء من وقت لآخر. في حالة وجود الإندول يتكون لون أحمر غامق في طبقة الكحول ويصعد إلى سطح الوسط. ظهور اللون الأحمر ربما يأخذ عدة دقائق ولذلك تحتاج في بعض الأحيان إلى تكرار هز الأنبوبة حتى يظهر اللون. لا تعتبر النتيجة سالبة (عدم ظهور

اللون الأحمر) حتى مضي 10 إلى 15 دقيقة بعد إضافة المفاعل أو الكاشف والهز المتكرر. كرر نفس الخطوات مع أنبوبة الشاهد Control التي لا تحتوي على بكتيريا. سجل نتائجك بدقة.

تمرين (46): إختبار أحمر الميثيل Methyl Red Test

1. إحقن ملء حلقة زرع من البكتيريا **E. cloacase, E. coli** كل في أنبوبة تحتوي على الوسط الحسائي MR.VP. الأنبوبة الثالثة اتركها بدون حقن وتعتبر كشاهد control للمقارنة.
2. كذلك تأكد من تمييز Labeling كل أنبوبة قبل الاستمرار في المعمل.
3. هذه الأنابيب الثلاثة سوف تستعملها لكلا التحليلين أي اختبار أحمر المثيل وفوقس بروسكاول.

إختبار فوقس بروسكاور (تمرين 47) سوف نتطرق إليه بعد اختبار أحمر الميثيل.

4. ضع الأنابيب الثلاث في الحاضنة عند 37 درجة مئوية لمدة 48 ساعة. سوف تقوم بتقسيم المزارع وإضافة المفاعلات Reagents لعمل الاختبارين **Methyl Red, Voges Proskuaer** خلال المرة القادمة للجزء العملي.
6. في لقاء المعمل القادم وبعد انتهاء 48 ساعة من التحضين، أنقل بواسطة ماصة معقمة 2 مل من المزرعة **MR - VP E. coli culture** إلى أنبوبة اختبار فارغة ومعقمة.
6. ضع جانباً هذه الأنبوبة المحتوية على 2 مل من مزرعة **E. coli** لكي يتم استعمالها خلال إجراء اختبار **Voges - Proskauer**. تأكد من كتابة البيانات على أنابيب الاختبار.
7. الآن أنقل بالماصة 2 مل من مزرعة **E. cloacae** إلى أنبوبة أخرى فارغة

ومعقمة كما فعلت في الخطوة السابقة مع E. coli. الآن عندك أنبوبتان لكل مزرعة.

8. من أجل إجراء اختبار أحمر المثيل أضف قطرة Dropperful من المؤشر أحمر الميثيل Methyl Red Indicator إلى المحلول المتبقي من مزرعة E. coli في الوسط. MR - VP Medium تغير في اللون يظهر في الحال. إذا أصبح اللون الأحمر Red color فإن الاختبار موجب Positive. إذا كان اللون أصفراً إلى برتقالي فإن الاختبار سالب Negative. تذكر بأنك تختبر إنتاج الأحماض المتولدة من أيض الجلوكوز Glucose Metabolism بواسطة E. coli.

9. أعد الاختبار باستعمال المحلول المتبقي من مزرعة E. cloacae ولا تنسَ أن تجري الاختبار في كل مرة مع أنبوبة الشاهد Control Tube. دوّن النتائج التي تحصلت عليها.

تمرين (47):

إختبار فوقس بروسكاور Voges Proskauer Test

لهذا الاختبار لا نحتاج إلى زراعة وسط وإنما المزارع التي عزلتها في الاختبار السابق (إختبار أحمر المثيل) سوف تستعملها هنا، وهذه المزارع تبلغ من العمر 48 ساعة وهي أنبوبتان تحتوي الأولى على 2 مل من مزرعة E. coli، والأخرى 2 مل من مزرعة E. Cloacae. اختبر كل أنبوبة على وجود مادة Acetyl Methyl Carbinol على النحو التالي:

1. أضف حوالي 10 قطرات من محلول بوريت (أ) Barritt's Solution (Alpha-Naphthol) ورج الأنبوبة من وقت إلى آخر.

2. أضف كمية متساوية من محلول بوريت (ب) Barritt's Solution ورج بقوة من وقت لآخر. كرر الرج كل دقيقتين أو ثلاث دقائق.

3. لاحظ ظهور لون وردي قرنفلي مركز intense Rose pink color في الأنابيب والذي يدل على أن الاختبار موجب positive. ربما تحتاج من 15 إلى 20 دقيقة قبل ظهور هذا اللون لذلك لا تتسرع في اعتبار نتيجة الاختبار سالبة Negative. الرج المتكرر لمدة 20 دقيقة يساعد في خروج اللون.

تمرين (48):

إختبار استغلال السيتريت Citrate Utilization

1. إزرع البكتيريا (كلا النوعين) على وسط الأجار المائل Simmon's Citrate Agar Slants (كل نوع من البكتيريا على أنبوبة أجار مائل) واترك أنبوبة ثالثة بدون زرع كشاهد control. تأكد من تمييز كل أنبوبة Labeling.
2. ضع الأنابيب الثلاثة في الحاضنة في 37 درجة مئوية لمدة 48 ساعة.
3. بعد 48 ساعة من النمو في الحاضنة اختبر النمو على سطح الاجار المائل في أنابيب الاختبار وقارنها بالأنبوبة الشاهد من حيث تغيير اللون. تغير اللون من الأخضر Green إلى الأزرق Royal Blue يدل على أن الاختبار موجب Positive وأن البكتيريا لها القدرة على استعمال السيتريت Citrate كمصدر للكربون.
4. سجل نتائجك بدقة وبإمكانك وضع النتائج في جدول كالآتي (جدول 7).

جدول (7). نتائج اختبارات إمفيك IMViC

Organism	Indole	Methyl Red	Voges Proskuauer	Citrate
E. coli				
E. cloacae				

+ الاختبار موجب - الاختبار سالب

أسئلة :

1. لماذا تنتج البكتيريا والفطريات الأنزيمات الخارجية Exoenzymes؟
2. هل تعتبر الأنزيمات الخارجية التي تنتجها البكتيريا الممرضة ضارة بالإنسان؟ ولماذا؟
3. أذكر ثلاثة أنواع من الإنزيمات الخارجية وميكانيكية عملها؟
4. لماذا يعتبر تحليل اليوريا مهماً في الكشف على بكتيريا **Proteus**؟
5. ما المقصود Mixed Acid Fermentation؟
6. ما فائدة مسحوق الزنك (الخارصين) عند إضافته في اختبار اختزال النترات؟
7. أذكر بعض الأوساط المستعملة في إنتاج كبريتيد الهيدروجين في البكتيريا؟
8. ما الغرض من إجراء اختبارات إمفيك IMViC Tests؟
9. ما أسباب عدم استغلال السيتريت عند بعض البكتيريا؟
10. لماذا تعتبر **E. coli** مؤشراً لتلوث المياه؟

الباب الخامس

تأثير العوامل الفيزيائية والكيميائية على نمو الميكروبات

Physical and Chemical Effects on Microbial Growth

تأثير الاكسجين على نمو البكتيريا

Effect of Oxygen on Bacterial Growth

الكائنات الدقيقة Microorganisms عادة تقسم إلى خمس فئات حسب احتياجاتها إلى جزيء الأكسجين (O_2):

1. ضرورية التهوية Obligate Aerobes
2. ضرورية عدم التهوية Strict or obligate Anaerobes
3. إختيارية التهوية Facultative Anaerobes
4. غير هوائية مع عدم تأثير الأكسجين عليها Aerotolerant Anaerobes
5. محبة لقليل من الأكسجين Microaerophilic

الكائنات الحية التي تحتاج إلى الأكسجين للحياة تعرف باسم Obligate aerobes أو Aerobes. هذه الكائنات تنتج الطاقة التي تحتاجها من خلال عمليات التنفس الهوائي Aerobic Respiration وتحتاج إلى الأكسجين لأنه المستقبل النهائي للإلكترونات وأيونات الهيدروجين.

أمثلة للبكتيريا ضرورية التهوية هي : **Pseudomonas fluorescens, Micro coccus Iuteus, Mycobacterium phlei**.

الكائنات الحية التي يقتلها الأكسجين والتي تنمو فقط في البيئات العديمة الأكسجين تسمى Anaerobes أو Obligate Anaerobes. الأكسجين يعتبر قاتلاً لهذه الكائنات لعدة أسباب منها:

1. عدم امتلاك هذه الكائنات لإنزيم Superoxide Dismutase أو وجوده بنسبة قليلة.
   هذا الإنزيم يغير المادة السامة (O_2^-) Superoxide التي تتكون في وجود الأكسجين إلى مادة فوق أكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide (H_2O_2).
2. ربما كذلك في عدم امتلاك هذه الكائنات لأنزيمي Peroxidase, Catalase واللذين يغيران H_2O_2 إلى مواد غير سامة.
3. أو احتمال وجود خمائر (أنزيمات) في هذه الكائنات حساسة للأكسجين Oxygen Sensitive Enzymes. الكائنات الدقيقة ضرورية عدم التهوية تتحصل على الطاقة من عمليات التخمر Fermentation أو التنفس اللاهوائي Anaerobic Respiration ولا تحتاج إلى الأكسجين كمستقبل نهائي للإلكترونات وأيونات الهيدروجين. أمثلة للبكتيريا ضرورية عدم التهوية أو اللاهوائية المتشددة هي : **Peptococcus anaerobius, Bacteroides fragilis, Chromatium Chlorobium** كذلك **Clostridium tetani**.

يمكن الحصول على بيئات غير هوائية Anaerobic في المعمل بها أقل من 0.1% أكسجين باستعمال The Gas Pak Anaerobic Jar (شكل 52). كذلك يمكن الحصول على بيئات غير هوائية باستعمال Agar shake - Cultures أو Pyrogallic Acid - Sodium Hydroxide Chemical system. الكائنات الدقيقة غير لاهوائية تنمو قليلاً أو لا تنمو عندما يكون تركيز الأكسجين أكثر من 0.4%.

بعض الكائنات عندها القدرة على التنفس في وجود الأكسجين ولكن تخمر المواد في نقص أو انعدام الأكسجين. هذه الكائنات التي عندها المقدرة على النمو بطريقة التنفس Respiring وبطريقة تخمرها للمواد تسمى اختيارية غير هوائية Facultative Anaerobic. أمثلة لبعض أنواع هذه البكتيريا هي: **Escherichia coli, Staphylococcus aureus**.

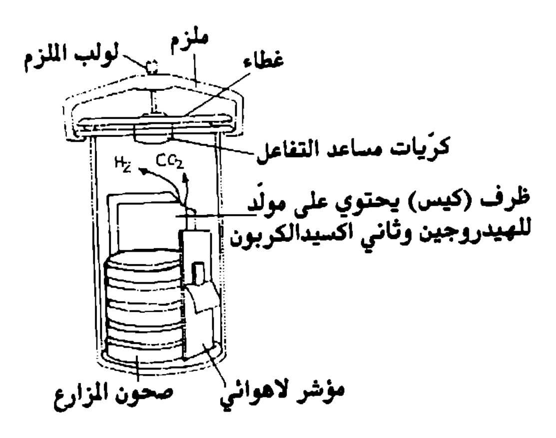
هناك مجموعة من الكائنات الدقيقة تخمر المواد تحت الظروف اللاهوائية والهوائية. الأكسجين لا يوقف عمليات التخمر في هذه الكائنات. هذه الكائنات الحية الدقيقة تسمى Aerotolerant Anaerobes. بعض الأمثلة لهذه الميكروبات (بكتيريا) هي: **Clostridium histolyticum, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus lactis**.

الكائنات الدقيقة التي تسمى Microaerophiles تحتاج إلى أكسجين ولكن تنمو فقط عندما يكون تركيز الأكسجين أقل من 15%. أغلب هذه الكائنات الدقيقة تنمو عندما يكون تركيز الأكسجين بين 15 و 10%. أمثلة لهذه الكائنات الدقيقة هي البكتيريا **Campylobacter fetus** وهي تسبب الإسهال Diarrhea والتهاب الجهاز الهضمي الحاد acute gastroenteritis. هذه البكتيريا يمكن نموها في مزارع مهزوزة Agar shake - Cultures أو استعمال Gas Pak Anaerobic Jar (شكل 52). هذا الجهاز يحتوي على أظرف خاصة Special Envelopes بها مواد كيميائية منتجة للهيدروجين H_2 وثاني أكسيد الكربون CO_2 عندما يضاف إليها ماء، حيث تتولد بيئة تحتوي على 5 إلى 12% CO_2 و 5 إلى 15% O_2. الهواء الجوي العادي يحتوي على 0.03% CO_2 و20% O_2.

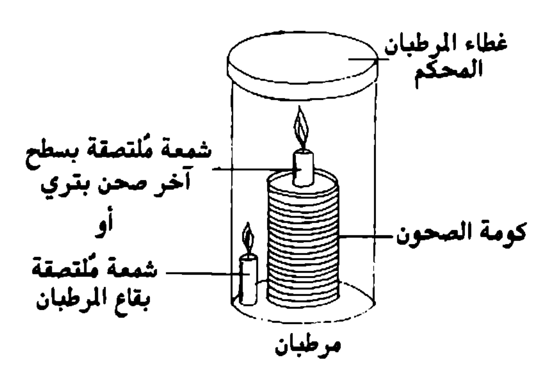
بعض الكائنات الدقيقة متعددة التغذية Heterotrophic تحتاج إلى هواء جوي مشبع بثاني أكسيد الكربون من أجل النمو جيداً. هذه الكائنات التي تفضل النمو عندما يكون تركيز ثاني أكسيد الكربون 5% أو أكثر تسمى Capnophiles، وفي نفس الوقت تعتبر هذه البكتيريا هوائية وتحتاج إلى الأكسجين للعمليات الأيضية. تعتبر البكتيريا **Neisseria sicca** مثالاً جيداً على

هذا النوع حيث إنها تنمو في هواء جوي يحتوي على 4% ثاني أكسيد الكربون و 16% أكسجين و 80 % نيتروجين. بالإمكان توفير هذه البيئة في المعمل باستعمال جهاز Candle Jar (شكل 53).

التمارين الآتية تسهل عليك فهم التأثيرات المختلفة للأكسجين على نمو الكائنات الحية الدقيقة وتعرفك بالطرق المختلفة لتوفير بيئات تحتوي على تركيزات مختلفة من الأكسجين وثاني أكسيد الكربون.



شكل (52). نظام التحضين اللاّهوائي An Anaerobic System



شكل (53). مرطبان A Candle Jar

تمرين (49):

نمو البكتيريا في عدم وجود الأكسجين

Growing Bacteria in an Anaerobic Gaspak Jar

جهاز Gaspak عامة يستعمل لنمو الكائنات الحية الدقيقة (بكتيريا) غير الهوائية في المعمل لأنه سهل الاستعمال وتنتج بداخله بيئة خالية تقريباً من الأكسجين. نظام هذا الجهاز يوفر جواً لا هوائياً وغنياً بثاني أكسيد الكربون ولذلك يحفز نمو الميكروبات المحبة لثاني أكسيد الكربون. يوجد داخل الجهاز ظرف يحتوي على مواد كيميائية تنتج هيدروجين H_2 وثاني أكسيد الكربون CO_2 عندما يضاف إليها ماء. بلورات البلاديوم Palladium Crystals المتواجدة أيضاً تساعد في اتحاد الهيدروجين والأكسجين (الموجود في الجهاز) إلى ماء H_2O.

المواد: Materials

- مزارع في الوسط Tryptic Soy Broth لأنوع البكتيريا الآتية:

  <u>Escherichia coli</u>

  <u>Micrococcus luteus</u>

  <u>Nisseria sicca</u>

  <u>Streptococcus lactis</u>

- أنابيب اختبار تحتوي على Plate Count Agar.
- جهاز Gaspak Anaerobic Jar به Palladium (جيد للاستعمال).
- غلاف (ظرف) يحتوي على مولد الهيدروجين وثاني أكسيد الكربون.
- ماء مقطر Dist.H_2O

ـ حاضنة بدرجة حرارة 35 درجة مئوية.

ـ مؤشر الأكسجين Oxygen Indicator.

الطريقة: Procedure

1. أسكب 10 صحون بالوسط PCA.

2. إزرع بالتخطيط أو المسح Streaking كل نوع من البكتيريا في صحنين للوسط PCA. إحدى المزارع تنمو في عدم وجود الأكسجين Anaerobically والأخرى في وجود الأكسجين Aerobically.

3. لا تنسَ أن تلصق رقعة (Label) على كل صحن حتى تستطيع أن تبين المزرعة الهوائية وغير الهوائية.

4. ضع أحد الصحون المزروعة في الحاضنة عند 35 درجة مئوية لمدة 48 ساعة والآخر في جهاز GasPak Anaerobic Jar والذي يحتوي على Palladium في الجزء السفلي من غطاء الجهاز.

5. إفتح شريط مؤشر الأكسجين Oxygen Indicator Strip وضعه في مكان مرئي داخل الجهاز. لون الشريط الأبيض يدل على جو بدون أكسجين Anaerobic بينما اللون الأزرق يؤشر إلى أن الهواء ما زال غنياً بالأكسجين Aerobic.

6. مزّق Tear off من الزاوية الغلاف أو الظرف المحتوي على هيدروجين وثاني أكسيد الكربون وضعه في Anaerobic Jar. ثم أضف 10 مل من الماء المقطر باستعمال الماصة Pipet إلى الغلاف عن طريق الفتحة الممزقة. فوراً ضع غطاء Anaerobic Jar واقفله يدوياً بإحكام. الظرف Gaspack ينتج ثاني أكسيد الكربون وهيدروجين بينما مساعد التفاعل المعدني Metal Catalyst (Palladium) في أعلى الجهاز يساعد في اتحاد الهيدروجين والأكسجين إلى الماء.

7. ضع الجهاز Anaerobic Jar في الحاضنة في درجة 35 مئوية لمدة 48 ساعة.

8. بعد انتهاء 48 ساعة وقبل فتح الجهاز تأكد من مؤشر الأكسجين حتى تضمن أن جو الجهاز أصبح بدون أكسجين. تذكر من جديد بأن اللون الأبيض للشريط يدل على عدم وجود الأكسجين واللون الأزرق يدل على وجود الأكسجين.

9. إفتح الجهاز وقارن بين النموات في الحاضنة العادية وفي جهاز Anaerobic Jar

10. ضع نتائجك في جدول موضحاً الآتي: نمو جيد (+ +)، نمو ضعيف (+) وعدم نمو (-).

تمرين (50):

نمو البكتيريا في مزارع الأجار المهزوز

Growing Bacteria in Agar - Shake Cultures

مزارع الأجار المهزوز Agar - Shake Cultures عبارة عن طريقة بسيطة لمعرفة ما إذا كان الكائن الدقيق هوائي أو غير هوائياً. خطوات هذا التمرين سهلة جداً وذلك بتذويب Melting أجار مغذٍ موجود في أنبوبة اختبار وعندما يبرد إلى درجة 47 درجة مئوية يحقن بالكائن الدقيق المراد دراسته. الكائنات الدقيقة المحبة للأكسجين تنمو على السطح وغير الهوائية تنمو في قاع الأنبوبة والاختيارية غير هوائية تنمو في كامل الأنبوبة (شكل 54).

المواد: Materials

- مزارع على الوسط TSB لأنواع البكتيريا الآتية: **Micrococcus, Clostridium perfringens, Escherichia coli, Streptococcus, Neisseria sicca**

ـ أنابيب اختبار تحتوي على TCA.

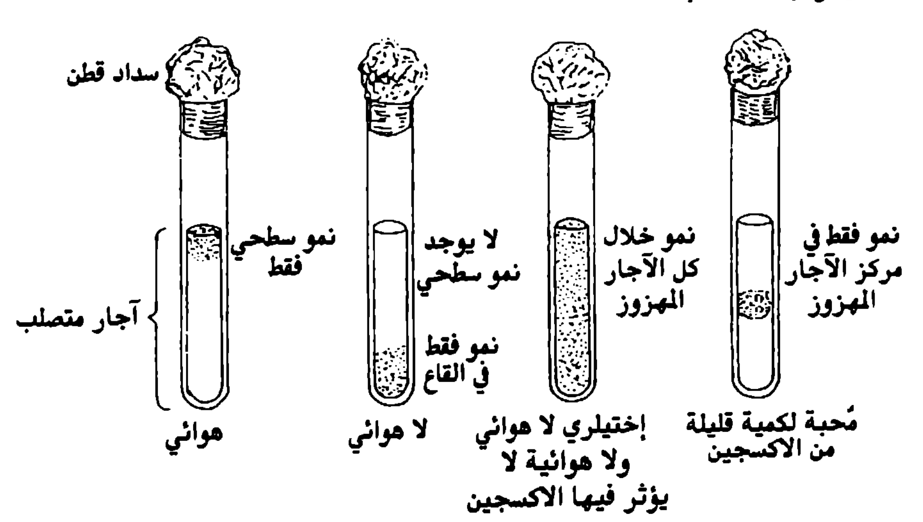
ـ ماصات ذات 1 مل.

ـ حاضنة في درجة حرارة 35 درجة مئوية.

الطريقة : Procedure

1. أذب PCA الموجود في 5 أنابيب واتركه يبرد حتى 50 درجة مئوية.

2. إحقن هذه الأنابيب بالبكتيريا أعلاه (نوع بكتيري مختلف في كل أنبوبة). الزرع أو الحقن يكون بواسطة 0.1 مل من المزرعة السائلة. تأكد من أن درجة الحرارة مناسبة حتى لا تقتل البكتيريا. إخلط المزرعة في الأنبوبة واتركها لتتصلب.



شكل (54). مزرعة الاجار المهزوز Agar Shake-Culture

3. ضع كل الأنابيب في الحاضنة في 35 درجة مئوية لمدة 48 ساعة.

4. إبحث عن النمو في كل أنبوبة ولاحظ الاختلافات بين النمو لكل نوع من البكتيريا.

5. دوّن نتائجك حسب المشاهدة.

تمرين (51):

نمو البكتيريا في نظام حامض البيروقاليك وهيدروكسيد الصوديوم.

Growing Bacteria in a Pyrogallic Acid - NaOH System

عند حقن أنبوبة تحتوي على أجار مغذ مائل Nutrient Agar Slant بإضافة حامض Pyrogallic و NaOH فإن الحامض له القدرة على اختزال الأكسجين في الأنبوبة إلى ماء عند تنشيطه بالقلوي NaOH (شكل 55).

المواد: Materials

- مزارع سائلة في الوسط TSB لأنواع البكتيريا (المذكورة أعلاه في التمرين السابق).
- أنابيب اختبار تحتوي على TSA مائل ومقفولة بالقطن Cotton Plugged
- بلورات الحامض Pyrogallic.
- 4 % محلول NaOH.
- مقص Scissor.
- سدادات مطاطية Rubber Stoppers.

الطريقة: Procedure

1. إحقن مجموعتين من أنابيب الأجار المائل TSA Slants بالبكتيريا (أنظر التمرين السابق) بحيث يوجد مزرعة واحدة في كل أنبوبة وبحيث يصبح الآن في حوزتك أنبوبتان مزروعتان بكل نوع من البكتيريا.

2. أكتب على كل أنبوبة البيانات اللازمة.

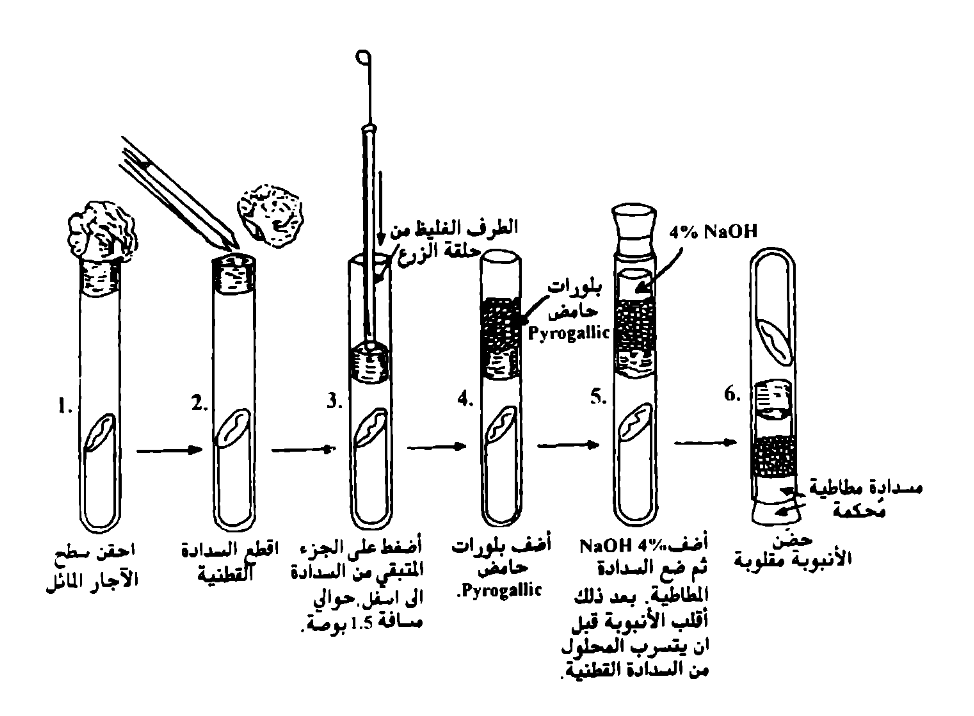
3. خذ مجموعة من الأنابيب (عدد 6) ثم احصد أو قص الغطاء القطني Cotton Plugs باستعمال المقص حتى يتساوى القطن داخل الأنبوبة مع سطح الأنبوبة. بعد ذلك إدفع Push القطن داخل الأنبوبة بمقدمة إبرة الحقن حتى يلمس القطن تقريباً حافة الأجار المائل داخل الأنبوبة. أقفل بأحكام Seal مجموعة الأنابيب بسداد مطاطي Rubber Stoppers وأخيراً أقلب الأنابيب وضعها في درجة 35 درجة مئوية لمدة 48 ساعة.

4. أحصد أو قص القطن واضغط عليه في المجموعة الأخرى من الأنابيب كما فعلت في الخطوة (3).

5. إملأ الفراغ جزئياً بين القطن وسطح الأنبوبة ببلورات Pyrogallic Acid.

6. غطي البلورات ب 4% محلول NaOH بحيث تترك مكاناً لغلق الأنابيب بالسداد المطاطي ثم أغلق الأنابيب واقلبها.

7. ضع هذه المجموعة (الثانية) من الأنابيب مقلوبة في الحاضنة في 35 درجة مئوية لمدة 48 ساعة.



شكل (55). نمو البكتيريا في النظام الكيميائي Pyrogallic Acid - Sodium Hydroxide

8. إفحص الأنابيب بعد 48 ساعة واكتب نتائجك لكل نوع من البكتيريا في كل مجموعة من الأنابيب بحيث يكون نمو كثيف (+ +)، نمو قليل (+)، وعدم نمو (-).

تمرين (52):

نمو البكتيريا في مرطبان بداخله شمعة

(شكل 53) Growing Bacteria in a Candle Jar

الجرة أو المرطبان التي تحتوي على شمعة Candle Jar تستعمل غالباً

لنمو الميكروبات التي تحتاج إلى كمية قليلة من الأكسجين في مقابل حصولها على كمية أكبر من ثاني أكسيد الكربون Capnophilic Organisms. الشمعة المحترقة داخل المرطبان Jar تقلل من كمية الأكسجين من 20% إلى 16% تقريباً وترفع كمية ثاني أكسيد الكربون من 0.03% إلى 4%. الزيادة في ثاني أكسيد الكربون تحفز نمو هذه الميكروبات.

المواد: Materials

- مزارع سائلة في الوسط TSB للبكتيريا: **Micrococcus luteus, Clostridium perfringens, Escherichia coli, Streptococcus lactis, Neisseria sicca**
- أنابيب اختبار تحتوي على Plate Count Agar.
- شمعة Candle.
- حاضنة في درجة حرارة 35 مئوية.
- مرطبان Jar.

الطريقة: Procedure

1. إعمل مجموعتين من الصحون المحتوية على PCA.
2. إزرع كل نوع من البكتيريا أعلاه على صحنين من PCA.
3. أكتب البيانات على كل صحن.
4. ضع مجموعة من الصحون المقلوبة في الحاضنة في 35 درجة مئوية لمدة 48 ساعة وضع المجموعة الأخرى مقلوبة في المرطبان الذي بداخله الشمعة.
5. أشعل الشمعة في المرطبان بحيث تترك فضاء أعلى الشمعة حتى لا تتسبب في حرق غطاء المرطبان.

6. أقفل بإحكام غطاء المرطبان، بحيث لا يدخل هواء من الخارج.
7. ضع المرطبان في الحاضنة في 35 درجة مئوية.
8. بعد 48 ساعة إفتح المرطبان وافحص الصحون، كذلك إفحص الصحون الموضوعة في الحاضنة العادية.
9. أكتب نتائج كل صحن: عدم نمو (-)، نمو قليل (+)، نمو كثيف (+ +).

أسئلة:

1. لماذا تحتاج الكائنات الحية الهوائية إلى الأكسجين؟
2. كيف يقتل الأكسجين الكائنات الحية اللاهوائية؟ كيف تتحصل هذه الكائنات على الطاقة؟
3. كيف ننمي الكائنات الدقيقة في البيئات بدون أكسجين؟
4. عـــــرف الآتـــــي، Aerotolerant Anaerobes, Capnophiles, Facultative, Anaerobes, Microaerophiles.

تأثير الحرارة على نمو البكتيريا
Effects of Temperature on Bacterial Growth

تعتبر درجة الحرارة أحد العوامل الفيزيائية الهامة التي تؤثر على نمو الكائنات الحية الدقيقة. الخلية البكتيرية البسيطة تفتقر إلى أجهزة تنظيم الحرارة Homeostatic Mechanisms التي تتولد أثناء العمليات الأيضية والموجودة في النباتات الراقية والحيوانات، لهذا فإن نظام الأنزيمات البكتيري يتأثر مباشرة بالعوامل البيئية مثل درجات الحرارة.

التفاعلات الأنزيمية تصل إلى أقصى سرعتها ونشاطها عند درجة الحرارة المثلى Optimum Temp التي تختلف من بكتيريا إلى أخرى، خارج درجة

الحرارة العليا Maximum أو أقل من درجة الحرارة الدنيا Minimum Temp تكون الأنزيمات غير نشطة Inactive. الأنزيمات تتكون من بروتينات ودرجات الحرارة العالية تغير من تركيب البروتينات Denature Proteins مما ينتج عنه تغيرات غير عكسية Irreversible وهدم كلي للأنزيم Total Enzyme Destruction وموت الخلية البكتيرية، أما عند درجات الحرارة المنخفضة جداً فإن الأنزيم يصبح عندها غير نشط. تأثير درجات الحرارة القاتل للبكتيريا مهم جداً خاصة في صناعة وتعليب الأطعمة.

زمن تعريض البكتيريا لدرجة الحرارة العالية عامل مهم في تقدير التأثير القاتل لدرجات الحرارة على البكتيريا. يجب أن يكون هناك مقياس معين عندما نقارن حساسية أنواع مختلفة من البكتيريا لدرجات حرارة عالية، لهذا الغرض هناك طريقتان ذات أهمية:

1. درجة الحرارة القاتلة The Thermal Death Point وهي درجة الحرارة اللازمة لقتل الميكروب (مثل البكتيريا) خلال عشر دقائق من تعريضه لدرجة الحرارة.
2. زمن الحرارة القاتل The Thermal Death Time وهو الزمن اللازم لقتل الميكروب أو الأبواغ Spores خلال درجة حرارة ثابتة.

إنتاج الصبغات في البكتيريا تتحكم فيه أنزيمات يمكن أن يتوقف نشاطها عند درجات حرارة عالية جداً Temperature Extremes.

تمرين (53):

تأثير الحرارة على إنتاج الصبغات في البكتيريا

Effects of Incubation Temp on Bacterial Pigment Production

المواد: Materials

- مزرعة في حساء مغذٍ NB Culture للبكتيريا **Serratia marcescens**

ـ أنابيب تحتوي على أجار مغذٍ مائل (عدد 2).

الطريقة: Procedure

1 . إزرع بكتيريا **S. marcescens** في كلا أنبوبتي الأجار المغذي المائل.

2 . ضع إحدى الأنبوبتين في درجة حرارة 25 مئوية والأخرى في 40 درجة مئوية لمدة 24 إلى 48 ساعة.

3 . إفحص المزرعتين في الأنبوبتين وشاهد الفرق وسجل درجة الحرارة التي عندها يتم إنتاج الصبغة في البكتيريا.

تمرين (54):

تأثير الحرارة على بكتيريا منتجة للأبواغ وبكتيريا أخرى غير منتجة للأبواغ: درجة الحرارة القاتلة - Lethal Effects of Temp. on a Spore Forming Bacterium and a Nonspore - Forming Bacterium: Thermal Death Point

المواد: Materials

ـ زجاجة تحتوي على مزارع سائلة في الحساء المغذي للبكتيريا **E. coli**, **Bacillus subtilis**، عمرها 48 ـ 72 ساعة.

ـ صحون بتري تحتوي على أجار مغذٍ (عدد 2).

ـ أنابيب اختبار فارغة معقمة (عدد 10) بغطاء caps.

ـ ماصات حجم 10 مل مقفلة بالقطن ومعقمة (عدد 2).

ـ أنبوبة اختبار تحتوي على حوالي 10 مل ماء صنبور.

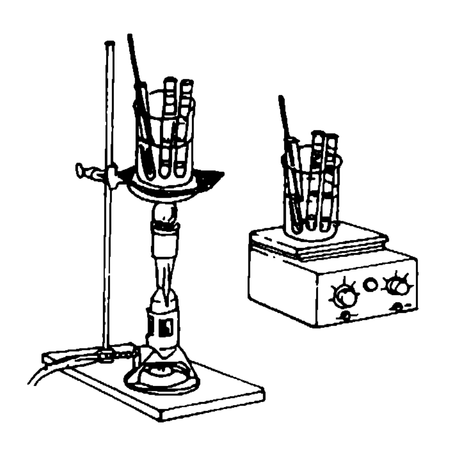
ـ مقياس حرارة Thermometer, Celcius.

ـ قلم شمعي للكتابة على الزجاج.

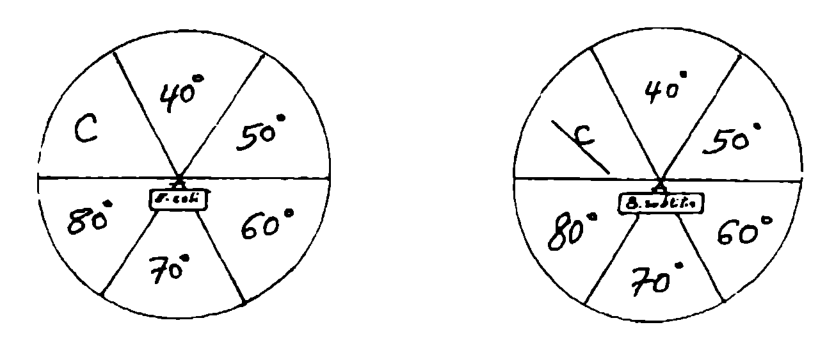
- حمام مائي Water Bath (شكل 56).
- جهاز تسخين وخلط Hot Plate Stirrer (or Burner and Ring Stand or Tripod)
- كوب مقياس 600 مل Beaker.
- ماء صنبور (حوالي 300 مل) Tap Water.

الطريقة : Procedure

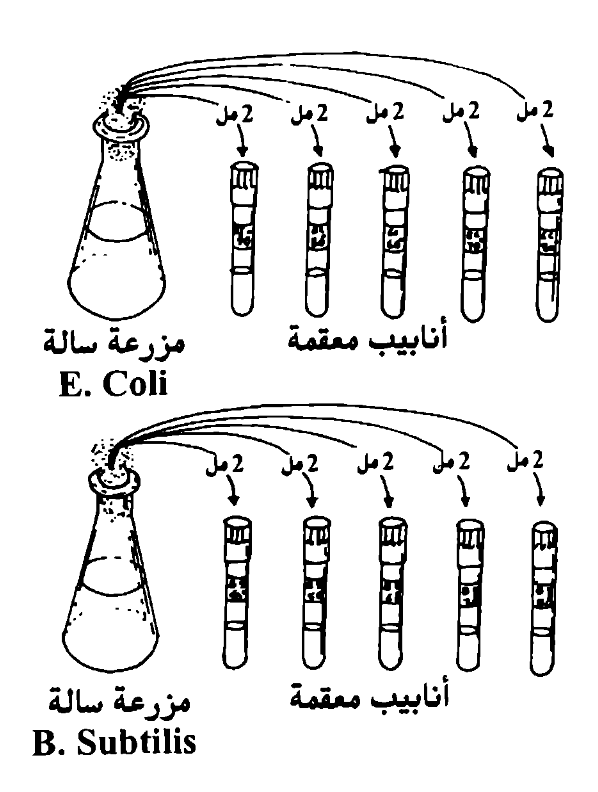
1. بواسطة القلم الشمعي أو خطاط قسّم قاع صحني الأجار المغذي إلى 6 أجزاء واكتب عليها البيانات كما في شكل (57).
2. الآن أكتب على قاع أحد الصحون **E. coli** وعلى الصحن الآخر **B. subtilis** أي إسم البكتيريا التي تزرع على كل صحن.
3. يجب أخذ الحذر بعدم الخلط بين الأجزاء أثناء الزرع.
4. أكتب درجة الحرارة على كل جزء كما في شكل (57).



شكل (56). نوعان من نظام الحمام المائي Water Baths



شكل (57). تأثير درجة الحرارة على نمو البكتيريا. صحون تحتوي على الأجار المغذي المعقم



شكل (58). تأثير درجة الحرارة على نمو البكتيريا. نقل وتمييز المزارع البكتيرية في الأنابيب

5 . خصص 5 أنابيب اختبار معقمة لكل نوع من البكتيريا وعلم الخمسة الأولى **E. coli** والخمسة الأخرى **B. subtilis**.

6 . أنقل 2 مل من المزرعة السائلة إلى كل أنبوبة من الأنابيب الخمسة، وكرر ذلك مع المزرعة السائلة والأنابيب الخمسة الأخرى كما هو موضح في شكل (58).

7 . جهز الحمام المائي على اللوحة الساخنة Hot Plate بالحارك stirrer أو أداة مناسبة أخرى مثل Ring Stand كما في شكل (56). ضع مقياس الحرارة في الأنبوبة المحتوية على 10 مل ماء صنبور وضع الأنبوبة بمقياس الحرارة في الكوب المحتوي على 600 مل ماء صنبور وضع الكوب بما فيه في الحمام المائي.

8 . عندما تصل درجة حرارة الماء إلى 40 مئوية ضع الأنبوبة المحتوية على مزرعة **E. coli** والأنبوبة المحتوية على مزرعة **B. Subtilis** في حمام الماء. هذه الأنابيب تسخن لمدة 10 دقائق في هذه الدرجة، من أجل هذا تحكم في بقاء الماء على هذه الدرجة ولو اضطر الأمر إلى إبعاد الكوب لمدة قصيرة من على اللهب.

9 . بعد 10 دقائق في درجة 40 مئوية أبعد الأنبوبتين وازرع كل نوع. إعمل خطاً واحداً فقط Straight Stroke في القسم المخصص لذلك.

10 . تخلص Discard من الأنبوبتين بعد الزرع.

11 . ارفع الحرارة لحمام الماء إلى 50 درجة مئوية.

12 . ضع الأنبوبتين المميزتن 50 درجة مئوية في الحمام الساخن وابدأ في حساب الوقت.

13 . بعد انتهاء 10 دقائق أخرج الأنبوبتين وازرع كما سبق في الأقسام المخصصة لذلك.

14 . كرر نفس الخطوات بعد رفع درجات الحرارة إلى 60، 70، 80 درجة مئوية.

15 . عندما تكون قد زرعت كل الأجزاء Sectors على الصحنين، أقلب الصحون وضعها في الحاضنة عند درجة 30 مئوية لمدة 24 ساعة إلى 48 ساعة.

16 . في ساعات العملي القادم إمتحن الصحون واجمع المعلومات وضعها في جدول بحيث تدون النتائج كالآتي: يوجد نمو (+)، لا يوجد نمو (-).

17 . عين درجة الحرارة القاتلةTDP لكل نوع من البكتيريا.

18 . ناقش النتائج بناء على نوع البكتيريا المستعملة في التمرين.

تذكر دائماً بأن درجة الحرارة القاتلة TDP تختلف من سلالة Strain بكتيرية إلى أخرى وبأن السلالات المستعملة في هذا التمرين ربما تختلف في تأثرها بالحرارة عن سلالات أخرى لنفس الأنواع من البكتيريا المستعملة وهي **B. subtilis**.

باستعمال نفس مزرعة البكتيريا تستطيع أن تعد تجربة أخرى لقياس زمن الحرارة القاتل TDT على نوعي البكتيريا.

أسئلة:

1. لماذا تتأثر الخلية البكتيرية بدرجات الحرارة؟
2. لماذا لم تنتج بكتيريا **S. marcescens** صبغة في درجة حرارة الغرفة؟
3. عرف درجة الحرارة القاتلة (TDP) وزمن الحرارة القاتل (TDT)؟

تاثير الأشعة على البكتيريا

Effect of Radiation on Bacteria

تمرين (55):

تأثير الأشعة فوق البنفسجية على البكتيريا

Effects of Ultraviolet Radiation on Bacteria

بعض العوامل الطبيعية Physical Factors التي تؤثر على نمو البكتيريا

هي الأكسجين Oxygen Tension، درجة الحرارة Temp، تركيز أيونات الهيدروجين pH، الضغط الأزموزي Osmotic Pressure والإشعاع Radiation.

في الطبيعة نمو وبقاء الكائنات الدقيقة يتأثر بعمق بالعوامل الطبيعية أو الفيزيائية في البيئة المتواجدة بها هذه الكائنات، البكتيريا تختلف عن بعضها في درجة تأثير هذه العوامل عليها، فمثلاً علاقة البكتيريا الهوائية واللاهوائية بالأكسجين، وعلاقة البكتيريا بدرجة الحرارة، تأثير هذه العوامل على البكتيريا يساعدنا في التعرف على أنواع البكتيريا.

تستطيع أن تتحكم في الظروف الطبيعية في مجال محدود وذلك لقتل، كبح أو إبعاد الكائنات الدقيقة. مثال على ذلك هو استعمال مصابيح الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet Lamps كأجهزة تعقيم للتقليل من عدد البكتيريا في حجر العمليات Operating Rooms وكذلك في مخازن حفظ اللحوم Meat Storage Lockers.

هناك ملاحظتان عند استعمال الأشعة فوق البنفسجية:

1. الخلية البكتيرية يجب أن تكون في مجرى الأشعة المباشرة ويجب عدم وجود مواد مثل الماء، الزجاج أو أشياء أخرى في طريق مجرى الأشعة (الأشعة فوق البنفسجية تتحول إلى حرارة عند اصطدامها بزجاج أو ماء).

2. هناك علاقة بين فعالية القتل بهذه الأشعة من ناحية والمسافة بين البكتيريا والأشعة وزمن تعريض البكتيريا للأشعة من ناحية أخرى.

التأثير القاتل للبكتيريا Bactericidal Effect والتأثير الكابح لنمو البكتيريا Bacteriostatic Effect بواسطة الأشعة يعتبر غير محدود على الأشعة فوق البنفسجية. هناك أشعة أخرى مثل Gamma - Rays, Beta - Rays, X - Rays لها تأثيرات مشابهة على البكتيريا. هذه الأشعة تملك أطوالاً موجية

Wavelenghts أقصر بكثير من الضوء العادي White Light ويمتصها العامل الوراثي Hereditary Molecule داخل الخلية البكتيرية بسهولة. تعرض هذه الخلايا للأشعة لمدة طويلة يسبب ضرراً على العامل الوراثي لا يمكن إصلاحه Irreversible Damage مما ينتج عنه عدم قدرة الخلية على الانقسام وأخيراً موت الخلية.

علماء الوراثة الميكروبية Microbial Geneticists يستعملون شحنات صغيرة من الأشعة فوق البنفسجية لتغيير العامل الوراثي DNA. هذه التغييرات البسيطة في الصفات الوراثية عادة لا يمكن ترجيعها Irreversible ولكنها غير قاتلة للخلية Not Lethal. بهذه الطريقة تنتج طفرات Mutant Offspring بدلاً من موت الخلية. الطفرة Mutant عبارة عن كائن Organism يملك صفات وراثية تختلف بعض الشيء عن الصفات الوراثية في الكائن الأصل Parent.

الأشعة تستعمل طبياً لتغيير أو تحطيم الخلايا الخبيثة Malignant Cells. الخلايا السرطانية الخبيثة تتكاثر بسرعة أكبر بكثير من الخلايا العادية Normal Cells. أشعة الكوبالت Cobalt Radiation والتي تكون أقصر من الأشعة فوق البنفسجية ولهذا تنفذ خلال الأنسجة العميقة تستعمل عادة لتغيير جزء من DNA في الخلايا الخبيثة في محاولة لوقف تكاثرها غير المضبوط Uncontrolled Reproduction.

تنبيه Precaution: يجب أخذ الحذر بعدم النظر إلى الأشعة القادمة من مصباح الأشعة فوق البنفسجية. هذه الأشعة يمكن أن تضر الأعين في وقت قصير.

المواد: Materials

- مزرعة سائلة من البكتيريا **Serratia marcescens**

ـ ممسحة معقمة Sterile Cotton swab

ـ حاملات أنابيب اختبار (عدد 2) Test Tube Racks

ـ مصباح الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet Lamp

ـ نصفان من ورق الملاحظات الأبيض.

ـ صحون بتري تحتوي على أجار مغذي معقم (عدد 4).

الطريقة: Procedure

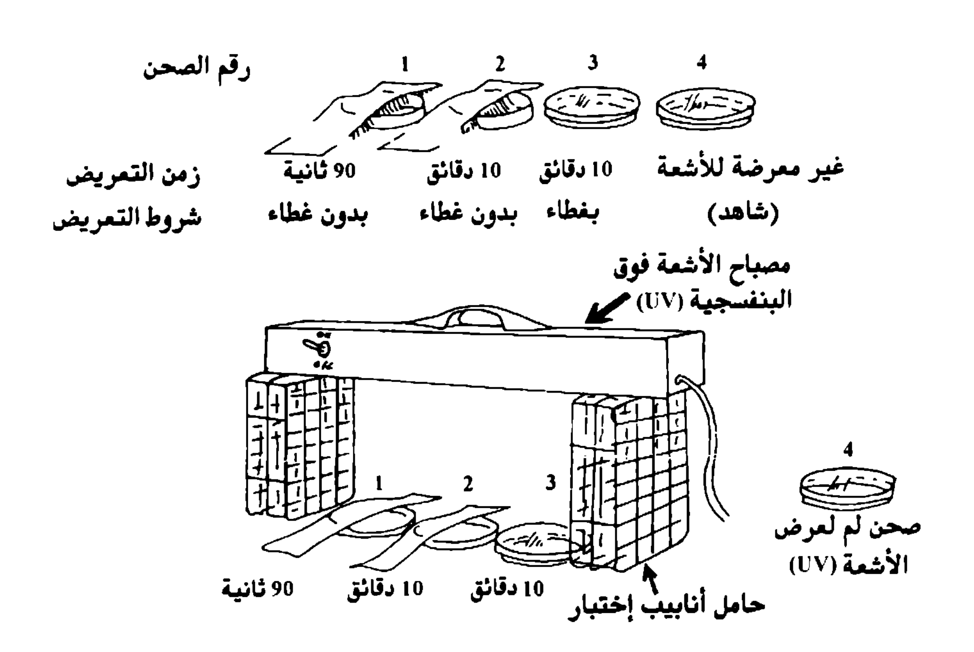
1. مصباح الأشعة فوق البنفسجية يجب أن يوضع على بعد حوالي قدم واحد من الخلايا المراد تعريضها للأشعة. من أجل هذا ضع حاملي الأنابيب كما هو مبين في شكل (59)، وضع مصباح الأشعة فوق البنفسجية فوقها (حاملي الأنابيب ترفع المصباح من طرفيه).

2. رقّم الصحون المحتوية على الأجار المغذي بالأرقام 1، 2، 3، 4.

3. إخلط مزرعة البكتيريا **Serratia marcescens** في الأنبوبة جيداً.

4. الآن باستعمال الممسحة المعقمة غطّس الممسحة في المزرعة السائلة وازرع البكتيريا بطريقة المسح Streaking على الصحون الأربع ومع ملاحظة أخذ كمية كبيرة Heavy Inoculum من البكتيريا فوق الممسحة ومسحها على سطح كل الأجار المغذي. دوّر الصحون على طاولة العمل ليتوزع اللقاح Inoculum جيداً. في كل مرة ولكل صحن يجب أن نغطس الممسحة في المزرعة السائلة.

5. عرض ثلاثة صحون للأشعة فوق البنفسجية كما في شكل (59)، مراعياً الأوقات والظروف المختلفة لكل صحن. صحن رقم 4 لا يعرض للأشعة ويعتبر كشاهد Control.



شكل (59). تعريض الخلايا البكتيرية للأشعة فوق البنفسجية

6. ضع الصحون الأربع مقلوبة في الحاضنة في درجة حرارة 37 مئوية لمدة 48 ساعة.
7. أكتب نتائج التمرين وملاحظاتك على نمو البكتيريا في كل صحن.

أسئلة:

1. أذكر بعض العوامل الطبيعية التي تؤثر على نمو البكتيريا.
2. ماذا يجب أن يؤخذ في الاعتبار عند دراسة تأثير الأشعة فوق البنفسجية UV Light على الخلايا البكتيريا؟
3. لماذا تعتبر هذه الأشعة قاتلة للبكتيريا؟

تاثير التركيز الأيوني للهيدروجين على نمو الميكروبات
Effects of pH on Microbial Growth

تمرين (56):

تأثير التركيز الأيوني للهيدروجين على نمو البكتيريا والفطريات
Effects of pH on Growth of Bacteria and Fungi

الكائنات الحية الدقيقة تنقسم عادة إلى ثلاث فئات (مجموعات) بناء على التركيز الأيوني للهيدروجين pH الذي عنده تنمو هذه الكائنات بأعلى سرعة Optimal pH:

1. الكائنات الدقيقة المحبة للحموضة Acidophiles وهي الكائنات الدقيقة التي تفضل النمو في تركيز أيوني للهيدروجين بين 2 و 5 وتنمو ببطء أو لا تنمو عند تركيز أيوني للهيدروجين متعادل أي (pH7). بعض الكائنات الدقيقة المحبة للحموضة بإمكانها النمو، عند تركيز هيدروجيني قرابة 1.0.

2. الكائنات الدقيقة التي تنمو بسرعة عند تركيز أيوني للهيدورجين بين 8.5، 10.0 تسمى Alkalophiles أو Alkalinophiles. هذه الكائنات الدقيقة تنمو أيضاً عند pH أعلى من 10 وبعضها عند pH 12 وكذلك فإن هذه الكائنات تنمو ببطء أو لا تنمو عند التركيز المحايد (pH7).

3. الكائنات الدقيقة (أغلبية البكتيريا) التي تنمو بسرعة عند pH7 تسمى Neutrophiles أو المحبة للتركيز المحايد لأيونات الهيدروجين. الكائنات الدقيقة التي تتحمل Tolerate تركيزات منخفضة أو عالية

لأيونات الهيدروجين تسمى Acidotolerant (Acidoduric) وAlkalotolerant Alkaloduric. أغلب الفطريات قادرة على تحمل الحموضة (Acid tolerant)، والعكس بالنسبة للبكتيريا والتي يكبح نموها عندما يقل التركيز الأيوني للهيدروجين عن 6.0.

الكائنات الدقيقة تغير من التركيز الأيوني للهيدروجين في البيئة التي تعيش فيها عندما تتكاثر؛ فالكائنات الدقيقة القادرة على تخمير المواد تفرز في الوسط أحماضاً وهذه بدورها تقلل من معدل pH إلى 3.5 أو أقل. الكائنات الدقيقة التي تؤكسد Respiring وتخمر Fermenting المواد البروتينية والأحماض الأمينية عن طريق العمليات الأيضية المختلفة تفرز أيونات الأمونيوم NH_4^+ وهذه بدورها تجعل بيئة الوسط قلوية وبذلك يرتفع معدل pH إلى أكثر من 7.0.

تغيرات كبيرة في معدل pH تحدث بسرعة في بيئة مقفلة Closed Environment مثل أنبوبة اختبار بها حساء مغذ مما يكبح Inhibit النمو الميكروبي ويعرقل نمو المزرعة. من أجل منع هذا التغيير في pH تضاف مواد كيميائية تعرف بالصاقل أو المصد Buffers إلى الوسط المغذي. أحد أنواع هذه الصواقل التي تستعمل كثيراً في الأوساط البكتيرية يتكون من ملح لقلوي ضعيف مثل K_2HPO_4 وملح لحامض ضعيف مثل KH_2PO_4. القلوي الضعيف K_2HPO_4 ترتبط به أيونات الهيدروجين عندما تنتج أحماضاً في الوسط ويصبح حامضاً ضعيفاً ولهذا يصقل البيئات الحمضية. الحامض الضعيف KH_2PO_4 يعطي أيونات الهيدروجين عندما ينتج غاز النشادر (Ammonia) في الوسط ويصبح قلوياً ضعيفاً، لهذا فإن الحامض الضعيف يصقل القلويات القوية (OH^- and NH_3) بتزويدها بأيونات الهيدروجين.

المواد: Materials

- مزارع في حساء الوسط TSB للبكتيريا الآتية: **Lactobacillus**

bulgaricus, Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens

ـ مزارع على الوسط **Sabouraud Dextrose Agar** للفطريات الآتية: **Saccharomyces, Penicillium, Rhizopus**.

ـ أنابيب اختبار معقمة تحتوي على TSB وتركيزات لأيونات الهيدروجين pH الآتية: 12، 11، 10، 9، 8، 7، 6، 5، 4، 3

الطريقة: Procedure

1. إحقن inoculate مجموعة من أنابيب TSB والمحتوية على قيم مختلفة من pH بكائن حي واحد فقط (بكتيريا أو فطر).
2. بوضوح أكتب على كل أنبوبة إسم الكائن الدقيق وقيمة pH في الأنبوبة.
3. ضع الأنابيب في الحاضنة في 28 درجة مئوية لمدة 48 ساعة.
4. كرر نفس الطريقة مع كل كائن دقيق آخر زودت به.
5. إبحث عن نمو في كل أنبوبة وذلك بملاحظة عكاره Turbidity وترسب Sediment أو نمو في أعلى الأنبوبة Pellicle.
6. سجل في قائمة التركيز الأيوني للهيدروجين الذي عنده نما (+) أو لم ينمُ (-) كل كائن دقيق درسته.

أسئلة:

1. كيف قسمت الكائنات الدقيقة بناء على علاقتها بالتركيز الأيوني للهيدروجين pH؟
2. كيف تغير الكائنات الدقيقة التركيز الأيوني للهيدروجين pH في الأوساط التي تنمو فيها؟
3. ما المقصود بالصواقل Buffers وكيف تعمل على تثبيت الـ pH في البيئات؟

تمرين (57):

تأثير ملح الطعام على نمو الميكروبات Effect of NaCI on Microorganisms

نمو البكتيريا يتأثر بشدة بكمية المياه الداخلة إلى أو الخارجة من الخلية. عندما تكون نسبة المواد الذائبة Solutes قليلة hypotonic solution في الوسط المحيط بالخلية فإن الضغط التناضحي Osmotic Pressure يرتفع داخل الخلية. باستثناء في بعض أنواع بكتيريا المياه المالحة Marine Bacteria هذه الحالة تعتبر غير ضارة بأغلب أنواع البكتيريا. تركيب جدار البكتيريا قوي وصلب وقادر على المحافظة على الخلية البكتيرية من الضرر بواسطة الانتفاخ swelling. على عكس ذلك، عندما توضع البكتيريا في وسط يحتوي على نسبة عالية من المواد الذائبة Hypertonic solution، حيث نمو هذه البكتيريا ربما يتوقف، درجة كبح النمو تعتمد على نوع المواد الذائبة في الوسط وطبيعة البكتيريا. في الأوساط ذات الضغط التناضحي العالي يخرج الماء من الخلية وتتعرض السيتوبلازم للجفاف وتنكمش shrinks وتبتعد من جدار الخلية، وهذه الخلايا تسمى (Plasmolyzed Cells) وتتوقف عن النمو في غياب كمية كافية من الماء داخل الخلية ولكن ترجع إلى النمو والنشاط عندما توضع في وسط متساو مع داخل الخلية أي Isotonic medium. في بعض الحالات يكون تأثير الضغط التناضحي غير رجعي irreversible بسبب استمرارية كبح نشاط الأنزيمات Permanent Inactivation of enzyme systems. في هذا التمرين نختبر تأثير تركيزات مختلفة من ملح الطعام NaCI على نمو بعض أنواع البكتيريا والفطريات.

المواد: Materials

- مزارع في الحساء المغذي Nutrient Broth للكائنات الحية الدقيقة التالية:

Penicillium, Rhizopus, Staphylococcus, Escherichia

ـ صحون بتري تحتوي على أجار مغذ NA بكميات مختلفة من ملح الطعام NaCl وهي:

0.5%, 1.0%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%

ـ حاضنة في درجة حرارة 20°C.

الطريقة: Procedure

1. قسم صحن بتري المحتوي على 0.5% من ملح الطعام إلى أربعة أقسام.
2. إزرع بإبرة الزرع كل قسم بكائن حي دقيق مختلف (أربعة كائنات دقيقة).
3. إزرع بقية الصحون المحتوية على تركيزات أعلى بنفس الطريقة.
4. ضع جميع الصحون المزروعة في الحاضنة في درجة حرارة 20 درجة مئوية (درجة حرارة الغرفة تقريباً) لمدة 2 ـ 4 أيام.
5. أخرج المزارع من الحاضنة واكتب النتائج وناقش تأثير ملح الطعام بتركيزات مختلفة على نمو هذه الميكروبات.

أسئلة:

1. اشرح علاقة الخلية البكتيرية بتركيز المواد الذائبة Solutes في الوسط التي تنمو فيه.
2. متى يكون الضغط التناضحي Osm. Pressure قاتلاً للخلية البكتيرية؟

تمرين (58):

تأثير سكر القصب على نمو الميكروبات

Effects of Sucrose on Microorganisms

في هذا التمرين نختبر تأثير تركيزات مختلفة من سكر القصب Sucrose

على نمو بعض أنواع البكتيريا والفطريات بنفس الكيفية التي اختبرنا بها ملح الطعام (تمرين 57).

المواد: Materials

ـ مزارع في الحساء المغذي NB للكائنات الدقيقة التالية:

Rhizopus, Saccharomyces, Staphylococcus, Escherichia, Penicillium

ـ صحون بتري تحتوي على أجار مغذ NA بها تركيزات مختلفة من سكر القصب Sucrose وهي 1.0%, 5%, 10%, 20%, 40%, 60%.

ـ حاضنة في درجة حرارة 20 مئوية.

الطريقة: Procedure

1. قسم صحن بتري المحتوي على 1% من سكر القصب إلى خمسة أقسام.
2. إزرع بإبرة الزرع كل قسم بكائن حي دقيق مختلف.
3. قسم بقية الصحون بنفس الطريقة وازرع بنفس الطريقة على التركيزات الأخرى (5, 10, 20, 40, 60%).
4. ضع جميع الصحون المزروعة في الحاضنة في درجة 20 مئوية (درجة حرارة الغرفة تقريباً) لمدة 2 ـ 4 أيام.
5. أخرج المزارع من الحاضنة واكتب النتائج وناقش تأثير سكر القصب Sucrose على نمو الميكروبات.

أسئلة:

1. من خلال نتائج هذا التمرين ناقش تأثير سكر القصب على الفطريات والبكتيريا ـ هل هناك اختلاف؟ لماذا؟.

تاثير المطهرات على نمو الميكروبات

Effects of Disinfectants and Antiseptics on Microbial Growth

بعض المواد الكيميائية تؤثر في نمو وتكاثر الميكروبات وخاصة البكتيريا. هذه المواد تسمى Disinfectants و Antiseptics.

هل هذه المواد الكيميائية تعتبر أداة تطهير؟ نحن نعرف مما سبق بأن التعقيم Sterilization يعتبر قاتلاً للبكتيريا Bactericidal. هذا يعني بأن التعقيم يقتل كل الكائنات الدقيقة داخل أو على سطح شيء معين أو مادة (باستثناء التعقيم بالترشيح Filtration الذي لا يقتل وإنما يبعد الكائنات الدقيقة من وسط سائل معين). بعض المطهرات Disinfectants أو Antiseptics تعتبر قاتلة للميكروبات أي Microbicidal وأخرى تكبح النمو Microbiostatic أي توقف النمو Inhibitors.

المطهرات من نوع Disinfectants تستعمل لتطهير الأشياء مثل الأجهزة والأرضيات وأسطح طاولات العمل في المعامل وغيرها. أما المطهرات من نوع Antiseptics فإنها تستعمل على الأنسجة الحية Living Tissues مثل جلد الإنسان Human Skin أو داخل الحنجرة لتطهيرها من الميكروبات الممرضة.

تمرين (59):

التأثير غير الكمي لعدة مطهرات على البكتيريا

Non quantitative Demonstration of Antibiosis

المواد: Materials

- مزارع سائلة للبكتيريا: E. coli, Staphylococcus aureus

ـ 4 مطهرات Disinfectants أو Antiseptics (تحضر من البيت أو العمل).

ـ ممسحة معقمة (عدد 2) Sterile Cotton Swabs.

ـ صحون بتري تحتوي على أجار مغذ (عدد 2) NA Plates.

ـ أقراص ورق ترشيح صغيرة ومعقمة Sterile Filter Paper Disks

الطريقة: Procedure

1. باستعمال ممسحة معقمة مغطسة في مزرعة **E. coli** السائلة، إمسح سطح أحد صحون NA بكثافة لكي تحصل على نمو مندمج Confluent Growth بعد التحضين.

2. كرر نفس الشيء مع مزرعة بكتيريا **Staphylococcus aureus** باستعمال ممسحة معقمة أخرى وصحن أجار مغذ آخر.

3. رقّم المطهرات الأربع التي ترغب في اختبارها من 1 إلى 4.

4. قسّم السطح الخلفي لصحون الأجار المغذي إلى أربعة أجزاء باستعمال قلم شمعي Wax marking Pencil ورقّمها 1، 2، 3، 4.

5. عقّم مقدمة الكلاب Forceps بواسطة تمريره على اللهب عدة مرات.

6. إلتقط قرص ورق الترشيح الصغير المعقم بواسطة الكلاب وغطسه في المطهر رقم 1 وتأكد من أنه لا يوجد مطهر زائد Excess Disinfectant يتقاطر من القرص.

7. ضع القرص في مركز الجزء رقم 1 على الصحن المزروع ببكتيريا **Staphylococcus aureus**.

8. باستعمال نفس المطهر ضع قرصاً آخر مغطساً على الجزء رقم 1 على الصحن المزروع ببكتيريا **E. coli**.

9. أنت تقارن بين تأثير كل مطهر على كلا النوعين من البكتيريا وكذلك وبنفس الطريقة ضع بقية المطهرات على الأجزاء المخصصة لها على كلا الصحنين المزروعين.

10. عندما تكون كل الأربعة أقراص المشبعة بالمطهرات قد وضعت على الأربعة أجزاء على كل صحن، أقلب الصحون واكتب عليها البيانات وضعها في الحاضنة في 30 درجة مئوية لمدة 48 ساعة.

11. في ساعات العملي القادم قارن بين حجم مناطق توقف النمو Inhibition zones حول كل قرص على المزرعة البكتيرية. وباستعمال المقاييس التالية يمكن استنتاج تأثير كل مطهر على كل نوع من البكتيريا:

- الأكثر تأثيراً + + +
- تأثير متوسط + +
- قليل التأثير +
- مقاومة (Resistance) R

أسئلة:

1. قارن بين Antiseptics و Disinfectants.
2. عرّف التعقيم.

تأثير المضادات الحيوية على نمو البكتيريا
Effects of Antibiotics on Bacteria

في هذا التمرين سوف تدرس تأثير المضادات الحيوية Antibiotics على البكتيريا. المضادات الحيوية تختلف عن المطهرات Antiseptics and Disinfectants وذلك لأنها مواد كيميائية تنتج بالكامل بواسطة الميكروبات

Biosynthesized by Bacteria and Fungiبينما المطهرات تعتبر من صنع أو تحضير الإنسان Man - made. كذلك تستعمل المضادات كعلاج داخل الإنسان أو على سطح الجسم بينما المطهرات تستعمل للتخلص من الميكروبات (التطهير) على أسطح الأشياء أي لا تستعمل داخل جسم الإنسان. المضادات الحيوية تعتبر مواد أو نواتج استثنائية Secondary Metabolites أو By - Products of Metabolism بالنسبة للميكروبات التي تنتجها ولكن تأثيرها يكون على ميكروبات أخرى. أغلب الأنواع Species والسلالات Strains التي تنتج المضادات الحيوية تتبع الأجناس Genera الميكروبية الآتية:

1 - **Streptomyces**

2 - **Bacillus**

3 - **Penicillium**

4 - **Cephalosporium**

عزل الميكروب الممرض The Pathogen من الشخص المريض غير كاف لتحديد العلاج اللازم. كثير من أنواع البكتيريا وكذلك بعض الفطريات والفيروسات تتطور عندها باستمرار طرق لمقاومة المواد الكيميائية المضادة لها Antimicrobial Agents، لذلك وجب اختبار كل ممرض وخاصة البكتيريا بعد عزلها من عينة الشخص المريض على عدة مضادات حيوية أو مواد كيميائية أخرى مع مراعاة الآتي عند اختيار هذه المضادات **in vitro**:

1. إختبار المضادات الحيوية الأكثر فعالية ضد البكتيريا Gram - neg أو Gram - pos.
2. يجب أن يكون هذا المضاد الحيوي غير سام وتأثيراته أقل ما يمكن.
3. مراعاة التكاليف المادية لهذا المضاد الحيوي.
4. مراعاة سرعة تأثيره على البكتيريا الممرضة داخل الجسم.

هناك عدة طرق لاختبار **in vitro** المضادات الحيوية على البكتيريا. كل هذه الطرق تتلخص في الآتي:

1. طرق المزارع البكتيرية السائلة المخففة: Bacterial Broth Dilution Methods

2. طرق الأقراص المشبعة بالمضادات الحيوية: Bacterial Disk Diffusion Methods

هناك طرق أخرى ولكن متفرعة من الطرق العامة المذكورة أعلاه. إختبار تأثير المضادات الحيوية في المعمل اختبار **in vitro** أي خارج جسم الحيوان عكس اختبار **in vivo** أي داخل جسم الحيوان الحي. أكثر الطرق شيوعاً لاختبار تأثير المضادات الحيوية على البكتيريا في المعمل هي طريقة - Kirby Bauer لأنها طريقة معيارية أو قياسية Standardized Test ولذلك تعطي نتائج أكثر دقة.

تمرين (60):

اختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية بطريقة Kirby - Bauer (استعمال الأقراص المشبعة بالمضادات الحيوية).

المواد: Materials

- مزارع سائلة للبكتيريا **E.coli** و **S.aureus**
- ممسحات معقمة Sterile Swabs عدد (2)
- صحن بتري يحتوي على أجار مغذ معقم Nutrient Agar عدد (2).
- جهاز توزيع أقراص المضادات الحيوية Antibiotics Disk Dispenser (شكل 60).

ـ أقراص مشبعة بالمضادات الحيوية Antibiotics Disks

ـ مسطرة للقياس بالملليمتر Ruler.

الطريقة: Procedure

1 . غطّس بانفصال الممسحتين المعقمتين واحدة في المزرعة السائلة للبكتيريا **E. coli** والأخرى في المزرعة السائلة للبكتيريا **S. aureus** وازرع البكتيريا على صحني الأجار المغذي المعقم (إزرع السطح بالكامل) ثم اكتب البيانات خلف كل صحن.

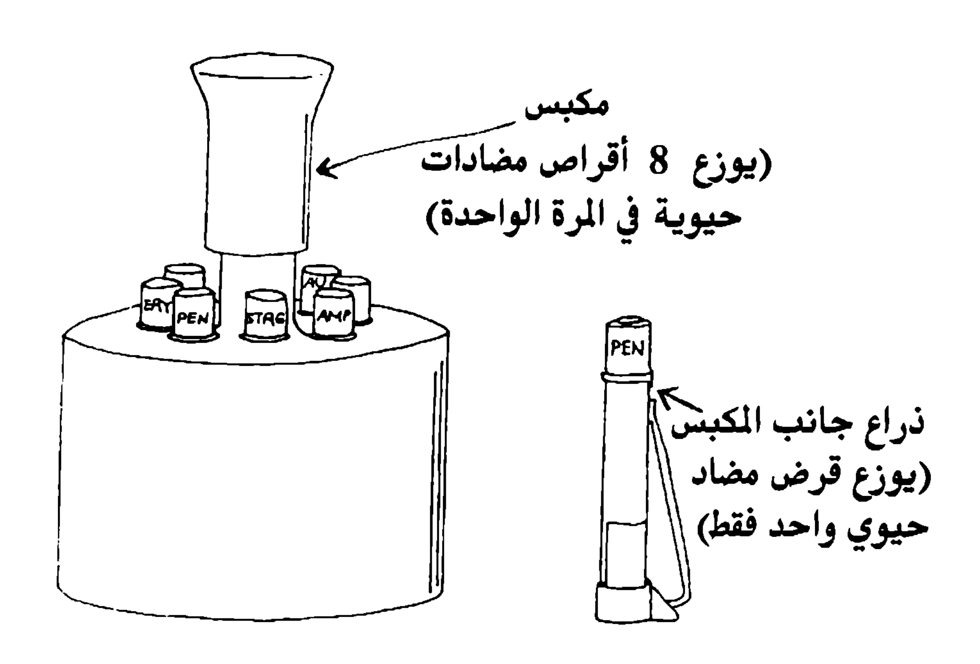
2 . باستعمال جهاز توزيع أقراص المضادات الحيوية (شكل 60) ضع 8 أقراص لمضادات حيوية مختلفة على كل صحن (مع مراعاة المسافة بين كل قرص وآخر)، ثم اضغط على الأقراص Aseptically للتأكد من التماسهما بالأجار.

3 . أقلب الصحنين وضعهما في درجة حرارة 30 أو 37 مئوية لمدة 24 ـ 48 ساعة.

4 . أكتب النتائج كالآتي (جدول 8).

جدول (8). قياس مناطق كبح النمو **Measurement of Inhibition Zones**

إسم المضاد الحيوي	قطر مناطق كبح النمو بالمليمتر	
	E. coli	**S. aureus**
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		



شكل (60). موزع أقراص المضادات الحيوية.

كلما كان قطر منطقة كبح النمو البكتيري أكبر كلما كان تأثير المضاد حيوي أقوى. هناك طريقة أخرى لرصد نتائج تأثير المضاد الحيوي وهي متبعة في اختبار الحساسية للمضادات الحيوية في معامل العيادات لمستشفيات وهي كالآتي:

تأثير ضعيف +

تأثير معتدل + +

تأثير قوي + + +

البكتيريا مقاومة Resistance, R

أسئلة :

1 . قارن بين المضاد الحيوي والمطهر

2 . عرف المضاد الحيوي.

3 . لماذا نختبر حساسية الميكروب الممرض **Pathogen** للمضادات الحيوية باستمرار بعد عزله من عينة المريض؟

4 . ماذا يجب أن يتوفر في المضاد الحيوي قبل اختباره على البكتيريا؟

الباب السادس

بكتيريا المياه

Water Bacteriology

الاختبار البكتيري للمياه (إختبار الجودة)

Bacteriological Examination of Water (qualitative Tests)

الماء الذي يحتوي على أعداد كبيرة من البكتيريا يمكن أن يكون جيداً للشرب. الشيء المهم الذي لا بد أن يؤخذ في الاعتبار هو أنواع الكائنات الحية الدقيقة المتواجدة في هذا الماء. مياه مصبات الأنهار Streamers والبحيرات العذبة Fresh Water Lakes والتي تحتوي على أعداد كبيرة من الميكروبات ذاتية التغذية Autotrophs والمترممة متعددة التغذية Saprophytic Heterotrophs تعتبر صالحة للشرب بشرط أن لا تحتوي على كائنات دقيقة ممرضة Pathogens للإنسان. ميكروبات الأمعاء الممرضة Intestinal Pathogens مثل تلك التي تسبب الحمى التيفودية Typhoid Fever، الكوليرا Cholera والديسنتريا البكتيرية Bacillary Dysentery يعتبر وجودها في المياه خطراً على صحة الإنسان. حقيقة أن فضلات الإنسان البرازية Human Fecal Material تنتقل عن طريق مياه المجاري Sewage System والتي غالباً ما تفرغ في الأنهار والبحيرات العذبة سببت للإنسانية في كل أنحاء العالم مشكلة صحية ضخمة. من هنا، تأتي أهمية اختبار مياه الشرب على وجود ميكروبات برازية

حتى نحافظ على مياه شرب نقية خالية من مصادر العدوى بالأمراض الجرثومية.

لو أننا اختبرنا الماء في كل مرة على التكوين الكلي للميكروبات الممرضة في الأمعاء فإن هذا يتطلب وقتاً طويلاً ومواد مكلفة، لذلك من السهل إثبات وجود بعض الميكروبات غير الممرضة non - Pathogenic التي مصدرها الأمعاء مثل البكتيريا Streptococcus faecalis, E. coli. هذه البكتيريا موجودة دائماً في الأمعاء وعادة لا توجد في التربة أو المياه. إذا وجدت هذه البكتيريا في مياه الشرب يمكن الاستنتاج بأن هذه المياه قد تلوثت Contaminated بمواد برازية Fecal Material. كل اختبارات الجودة البكتيرية Bacteriological Qualitative Testing على المياه تعتمد في الكشف على مؤشرات المجاري Sewage Indicators على مثل هذين النوعين من البكتيريا. مجموعة الاختبارات التي استعملت في هذا التمرين تعتبر الأكثر استعمالاً عند المتخصصين في مجال الصحة العامة Public Health Microbiologists. هذه الاختبارات تجرى للكشف على وجود بكتيريا القولون Coliforms وهي عبارة عن مجموعة من البكتيريا وتشمل Aerobacter aerogenes, E. coli، وتعرّف بكتيريا القولون كالآتي: عبارة عن بكتيريا اختيارية لاهوائية تخمر سكر اللاكتوز وتنتج منه غازاً وهي عصوية سالبة لصبغة جرام ولا تنتج أبواغاً.

«A coliform is a Facultative Anaerobe That Ferments Lactose to Produce Gas and is a Gram - Negative, Non - Spore - Forming Rod».

شكل (61) يوضح الخطوات المختلفة لاختبار جودة مياه الشرب. من الملاحظ أن الاختبارات منظمة في ثلاثة أجزاء: الاختبار الافتراضي Presumptive Test، الاختبار التأكيدي Confirmed Test، والاختبار المكمل Completed Test. كل جزء من هذه الاختبارات يهتم بتحديد صفات معينة لبكتيريا القولون. في الاختبار الافتراضي تدرس خواص تخمر اللاكتوز Lactose Fermentation. في الاختبار التأكيدي يتم زرع البكتيريا التي تظهر

اختباراً افتراضياً موجباً على أوساط مغذية تحفز البكتيريا السالبة لصبغة جرام Gram - neg. Organisms. الاختبار المكمل يثبت في النهاية بأن الكائن الدقيق (البكتيريا) المتواجد في الماء عبارة عن مخمر للاكتوز وسالب لصبغة جرام ولا يحتوي على أبواغ وعصوي الشكل.

تمرين (61):

الاختبار الافتراضي The Presumptive Test تحديد الرقم الأكثر احتمالاً.
Determination of the most probable Number (MPN)

في الاختبار الافتراضي تحقن سلسلة من الأنابيب المحتوية على حساء اللاكتوز Lactose Broth بمقادير معينة من الماء المراد اختباره. سلسلة الأنابيب ربما تتكون من ثلاث أو أربع مجموعات وكل مجموعة تحتوي على ثلاث، خمس أو أكثر من الأنابيب. كلما كان عدد الأنابيب كبيراً كلما أصبح الاختبار أكثر دقة. في هذا التمرين سوف نستعمل ثلاث مجموعات من الأنابيب وكل مجموعة تحتوي على ثلاث أنابيب في حالة اختبار المياه السطحية الصافية Clear Surface Water، ونستعمل أربع مجموعات من الأنابيب وكل مجموعة تحتوي على ثلاث أنابيب عندما نختبر مياه سطحية غير صافية Turbid Surface Water. إذا أنتجت البكتيريا غازاً Gas Production أثناء تخمر اللاكتوز في الجزء الأول من الاختبار (الاختبار الافتراضي) فإن هذا يكون دليلاً جيداً بأن نفترض وجود بكتيريا القولون في الماء. الأنابيب الموجبة في هذا الاختبار سوف تؤكد في الجزء الثاني من التمرين وهو الاختبار التأكيدي. الرقم الأكثر احتمالاً MPN لبكتيريا القولون المتواجدة في 100 مل من الماء الذي يتم اختباره، يمكن تحديده بواسطة عدد الأنابيب الموجبة The Number of Positive Tubes التي تظهر بعد مدة الحضانة، ويمكن إيجاده من الجدول (9).

أولاً: الماء السطحي الصافي Clear Surface Water

إذا كانت عينة الماء صافية Clear إتبع الخطوات التالية:

المواد: Materials

ـ 3 أنابيب درهم تحتوي على حساء اللاكتوز ثنائي التركيز 3 Durham Tubes of Double Strenght Lactose Broth (DSLB).

ـ 6 أنابيب درهم تحتوي على حساء اللاكتوز أحادي التركيز 6 Durham Tubes of Single Strength Lactose Broth (SSLB).

ـ ماصة ذات حجم 10 مل.

ـ ماصة ذات حجم 1.0 مل.

جدول (9).

تحديد الرقم الأكثر احتمالاً MPN من اختبار سلسلة الأنابيب

(Benson, 1973), Multiple Tube Test

NUMBER OF TUBES GIVING POSITIVE REACTION OUT OF			MPN INDEX Per 100ml	95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS	
3 OF 10 ml.each	3 OF 1 ml.each	3 OF 0.1 ml.each		Lower	Upper
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1.300
3	3	1	460	71	1.400
3	3	2	1.100	150	4.800

ملاحظة: المقصود بـ DSLB أن الأنابيب تحتوي على كمية مضاعفة من سكر اللاكتوز عما في الأنابيب SSLB.

الطريقة : Procedure

1. أنصب ثلاث أنابيب DSLB وستة أنابيب SSLB كما في شكل (61). أكتب على الأنابيب Label كمية الماء 10 مل، 1.0 مل و 0.1 مل كما في شكل (61).
2. أخلط Mix الماء المراد اختباره في القنينة بواسطة الاهتزاز Shaking 25 مرة.
3. بواسطة ماصة 10 مل أنقل 10 مل من الماء إلى كل أنبوبة في المجموعة DSLB.
4. بواسطة ماصة 1.0 مل انقل 1.0 مل من الماء إلى كل أنبوبة في المجموعة الأولى DSLB وكذلك 0.1 مل إلى كل أنبوبة في المجموعة الثانية لـ SSLB.
5. ضع كل الأنابيب في الحاضنة في درجة 35 مئوية لمدة 24 ساعة.
6. إختبر الأنابيب وسجل الأنابيب في كل مجموعة المحتوية على 10% غاز أو أكثر.
7. عيّن Determine الرقم الأكثر احتمالاً MPN وذلك بالرجوع إلى جدول (9) وسجل النتائج في تقرير المعمل Laboratory Report.

ثانياً: الماء السطحي العكر Turbid Surface Water

إذا كان الماء المراد اختباره عكراً ويحتوي على شوائب أي متلوث Polluted إتبع الخطوات الآتية:

المواد : Materials

ـ 3 أنابيب درهم تحتوي على DSLB

ـ 9 أنابيب درهم تحتوي على SSLB

ـ ماصة ذات حجم 10 مل

ـ ماصتان ذات حجم 1 مل.

ـ قنينة بها 99 مل ماء مقطر ومعقم 99 ml Sterile Water.

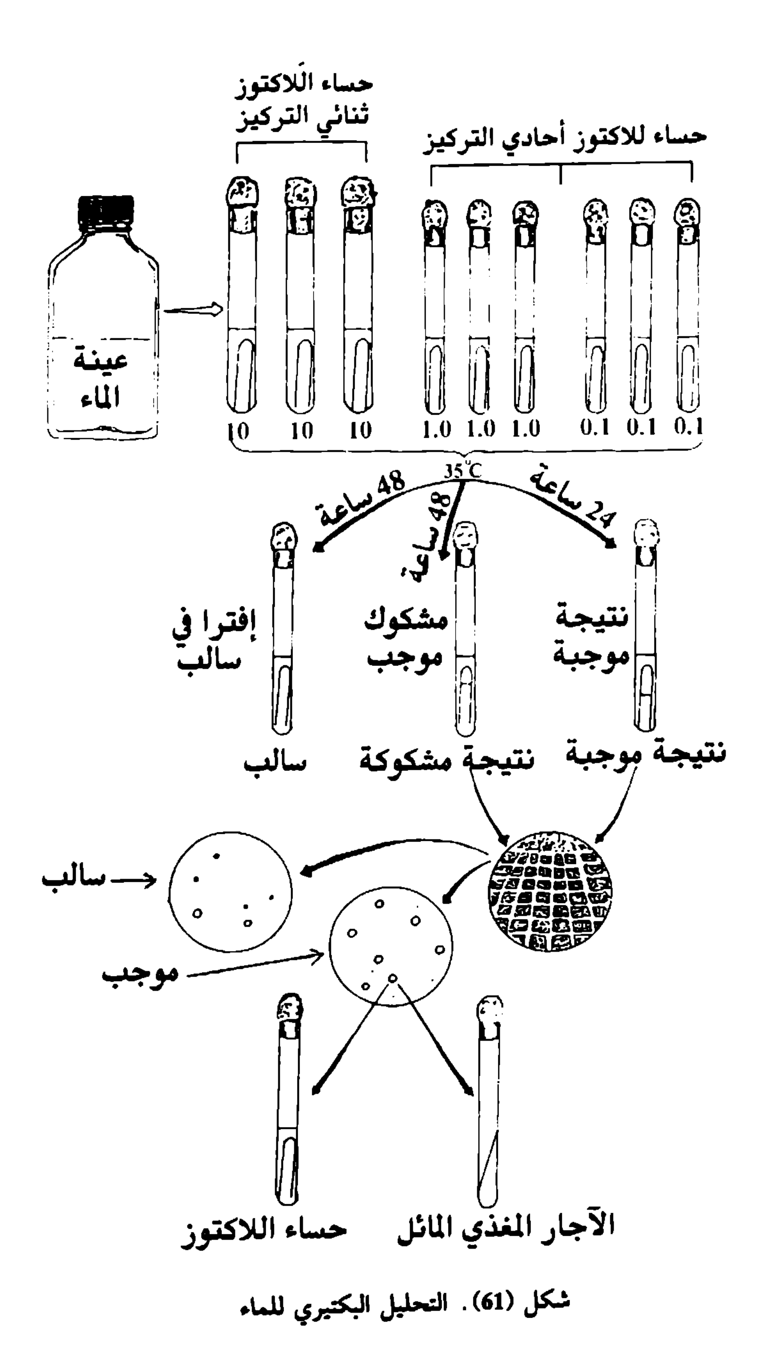
الطريقة: Procedure

1. أنصب 3 أنابيب DSLB، 9 أنابيب SSLB في حامل أنابيب اختبار Test Tube Rack مع وضع أنابيب DSLB على اليسار. أكتب على أنابيب DSLB: 10 مل، على الثلاث الأولى من أنابيب SSLB: 1.0 مل، على مجموعة الثلاث الثانية من أنابيب SSLB: 0.1 مل، وعلى مجموعة الثلاث الأخيرة من أنابيب SSLB: 0.01 مل.

2. أخلط الماء المراد اختباره في القنينة بواسطة الاهتزاز 25 مرة.

3. بواسطة ماصة 10 مل أنقل 10 مل من الماء لكل أنبوبة من أنابيب DSLB.

4. بواسطة ماصة 1.0 مل أنقل 1 مل من الماء لكل أنبوبة من الأنابيب الثلاثة في المجموعة الأولى لـ SSLB، و 0.1 مل من الماء لكل أنبوبة من الأنابيب الثلاثة في المجموعة الثانية لـ SSLB.



شكل (61). التحليل البكتيري للماء

5. باستعمال نفس الماصة (1 مل) أنقل 1 مل من الماء إلى القنينة المحتوية على 99 مل ماء معقم ورج القنينة جيداً (25 مرة).

6. باستعمال ماصة 1 مل أخرى معقمة أنقل 1 مل من القنينة إلى كل أنبوبة من أنابيب المجموعة الثالثة لـ SSLB. (هذا يعني كأنك أضفت 0.01 مل من الماء المراد اختباره قبل التخفيف).

7. ضع جميع الأنابيب في الحاضنة في درجة 35 مئوية لمدة 24 ساعة.

8. إفحص الأنابيب وسجل عدد الأنابيب في كل مجموعة المحتوية على 10% غاز أو أكثر.

9. عين الرقم الأكثر احتمالاً MPN من الجدول (9). هذا الجدول صمم لتسع (9) أنابيب فقط. عند استعمال 12 أنبوبة اتبع عند القراءة الآتي:

(أ) إختر مجموعات الأنابيب الثلاثة المتتابعة التي تحتوي على الأقل على أنبوبة واحدة بدون غاز.

(ب) إذا كانت المجموعة الأولى من الأنابيب (أنابيب 10 مل) لم تستعمل فما عليك إلاّ أن تضرب Multiply الرقم الأكثر احتمالاً MPN في العدد (10).

مثال 1: إذا كانت القراءات هي 1 ـ 3 ـ 3 ـ 3 فما هو MPN؟

الحل: المجموعة الأولى من الأنابيب (أنابيب 10 مل) يتغاضى عنها والأرقام (1 ـ 3 ـ 3) تقرأ من الجدول. الرقم الأكثر احتمالاً MPN المقابل لهذه الأرقام (1 ـ 3 ـ 3) هو 460.

إضرب هذا الرقم في 10 تحصل على MPN وهو 4600.

مثال 2: قراءة الأنابيب كانت 0 ـ 2 ـ 2 ـ 3. ما هو MPN؟

الحل: الأرقام الثلاث الأولى (2 ـ 2 ـ 3) تقرأ من الجدول وحيث أن

المجموعة الأخيرة من الأنابيب سوف يتغاضى عنها فإن الرقم الأكثر احتمالاً MPN هو 210.

تمرين (62):

الاختبار التأكيدي The Confirmed Test

في حالة إثبات وجود ميكروبات مخمرة للاكتوز ومنتجة للغاز فإننا نفترض بأن الماء غير مأمون unsafe ويعتبر خطراً للشرب ولكن إنتاج الغاز أثناء التخمر يمكن أن يكون راجعاً لبكتيريا غير قولونية Non-Coliform Bacteria. أمثلة على هذه البكتيريا هي **Clostridium perfringens** التي تعتبر موجبة لصبغة جرام ـ Gram Positive. لهذا وللتأكيد على تواجد مخمرات اللاكتوز السالبة لصبغة جرام، فإن الخطوة القادمة هي زرع العينات من الأنابيب الافتراضية الموجبة Positive Presumptive Tubes على أوساط مغذية اختيارية مثل Endo Agar, Levin's Eosin Methylene Blue Agar. الوسط Levin's EMB Agar يحتوي على صبغة أزرق الميثلين Methylene Blue التي تكبح inhibit نمو البكتيريا الموجبة لصبغة جرام. البكتيريا السالبة لصبغة جرام والتي تخمر اللاكتوز Lactose Fermenters ـ أي البكتيريا القولونية Coliforms ـ تنمو على هذا الوسط وتنتج مستعمرات colonies تحتوي على مركز مظلم Nucleated Colonies (dark centers). بكتيريا **E. coli** و **A. aerogenes** يمكن تفريقها بسهولة حيث أن **E. coli** تملك مستعمرات صغيرة وهذه المستعمرات تظهر لمعاناً أخضر معدنياً Greenish Metalic Sheen بينما **A. aerogenes** مستعمراتها كبيرة وتفتقر لهذا اللمعان الأخضر المعدني. هذا التفريق بين النوعين من البكتيريا لا يكفي، فالذي يجب معرفته هو أن وجود **E. coli** هو الدليل الأكبر على التلوث بمياه المجاري Sewage Indicator لأنها عادة لا تتواجد في التربة، بينما **A. aerogenes** عزلت من الحبوب Grains ومن التربة.

الوسط Endo agar يحتوي على صبغة Fuchsin Sulfite كمؤشر

Indicator يساعد على تعريف البكتيريا المخمرة للاكتوز. مستعمرات بكتيريا القولون Coliform Colonies والمنطقة المحيطة بهذه المستعمرات تظهر حمراء على هذا الوسط. البكتيريا التي لا تخمر اللاكتوز ـ Non Fermenters of Lactose تظهر بدون لون Colorless ولا تغير لون الوسط. بالإضافة إلى هذين الوسطين يوجد عادة أوساط أخرى بالإمكان استعمالها في الاختبار التأكيدي. أمثلة على هذه الأوساط هي Eijkman Medium, Brilliant Green Bile Lactose Broth, EC Medium.

في الاختبار التأكيدي نستعمل الوسطين: Levin's EMB Agar و Endo Agar.

المواد: Materials

- صحن بتري يحتوي على Levin's EMB Agar (الوسط الأول).
- صحن بتري يحتوي على Endo Agar (الوسط الثاني).

يقسم الطلبة إلى مجموعتين. في المجموعة الأولى يأخذ كل طالب صحناً للوسط الأول وفي المجموعة الثانية يأخذ كل طالب صحناً للوسط الثاني.

الطريقة: Procedure

1. إختر أنبوبة موجبة لحساء اللاكتوز من أنابيب الاختبار الافتراضي وازرع بطريقة التخطيط Streak على الوسط المعطى لك. استعمل طريقة مثالية للتخطيط حتى تحصل على مستعمرات نقية Pure Colonies. إذا كانت كل الأنابيب التي عندك من الاختبار الافتراضي سالبة، إستعر أنبوبة موجبة من طالب آخر.

2. ضع الصحن في الحاضنة في 35 درجة لمدة 24 ساعة.

3. إبحث عن مستعمرات نموذجية لبكتيريا القولون نامية على كلا الوسطين وسجل نتائجك في تقرير المعمل Laboratory Report. إذا لم تجد

بكتيريا قولونية فإن الماء يعتبر صالحاً للشرب Safe to drink.

ملاحظة: في هذا التمرين يجب تأكيد كل أنابيب الاختبار الافتراضي حتى نضمن دقة النتائج.

تمرين (63):

الاختبار المكمل: The Completed Test

الفحص النهائي Final Check للمستعمرات التي تظهر على أوساط الاختبار التأكيدي يتم بواسطة زرع المستعمرات على أجار مغذ مائل Nutrient Agar Slant وأنبوبة حساء اللاكتوز A tube of Lactose Broth. بعد 24 ساعة عند درجة حرارة 35 مئوية، نفحص حساء اللاكتوز إذا ما كان هناك إنتاج غاز Gas Production. كذلك نحضر لطخة للبكتيريا ونصبغها بصبغة جرام ونفحصها تحت العدسة الزيتية، فإذا ظهر الكائن الدقيق (بكتيريا) بأنه سالب لصبغة جرام ولا ينتج أبواغاً ويخمر اللاكتوز وعصوي الشكل فإننا نعرف الآن بأن بكتيريا القولون Coliforms متواجدة في عينة الماء الأصلية. إذا كان هناك وقت كافٍ ينصح بإجراء اختبارات إمفيك The IMViC Tests (تمارين 45 إلى 48).

أسئلة

1. لماذا تعتبر بكتيريا **Streptococcus faecalis, E. coli** مؤشر لتلوث المياه؟
2. اذكر بعض الأمراض التي تنتقل عن طريق المياه الملوثة
3. عرف بكتيريا القولون Coliform.
4. لماذا شمل الاختبار البكتيري للمياه على ثلاث اختبارات مكملة لبعضها؟
5. الأوساط المستعملة في الاختبار التأكيدي اختيارية وتفريقية. إشرح.
6. فرق بين مستعمرات **E. coli** ومستعمرات **A. aerogenes** على الوسط Levin's EMB Agar.

الباب السابع

بكتيريا الحليب

Bacteriology of Milk

تمرين (64):

الكشف على بكتيريا القولون في الحليب ومشتقاته:

Coliform Analysis of Milk and Dairy Products

في صناعة مشتقات الحليب Dairy Products وصناعات الأطعمة الأخرى، بكتيريا القولون Coliform تعتبر المؤشر الأساسي للجودة الصحية لهذه الأطعمة. في دراسة هذه البكتيريا في مشتقات الحليب نستعمل أثناء التحضين Incubation درجة حرارة 32 مئوية بينما نستعمل لدراسة الأطعمة الأخرى وتحاليل المياه درجة 35 مئوية.

المواد: Materials

- الوسط المغذي (Violet Red Bile Agar (V R B A
- حليب فج Raw Milk (غير مبستر أو معقم) أو حليب مضاف إليه حوالي 100 خلية قولونية Coliforms لكل 1 مل.
- أنابيب اختبار تحتوي على 9 مل ماء مقطر ومعقم للتخفيفات Dilution Blanks.

ـ صحون بتري معقمة.

ـ ماصات 1 مل معقمة.

الطريقة: Procedure

1 . إعمل تخفيفات Dilutions للحليب الفج Raw Milk كما هو مبين في الشكل (62).

2 . حدد بالكتابة ثلاثة صحون بتري معقمة كالآتي $10^{0}, 10^{-1}, 10^{-2}$

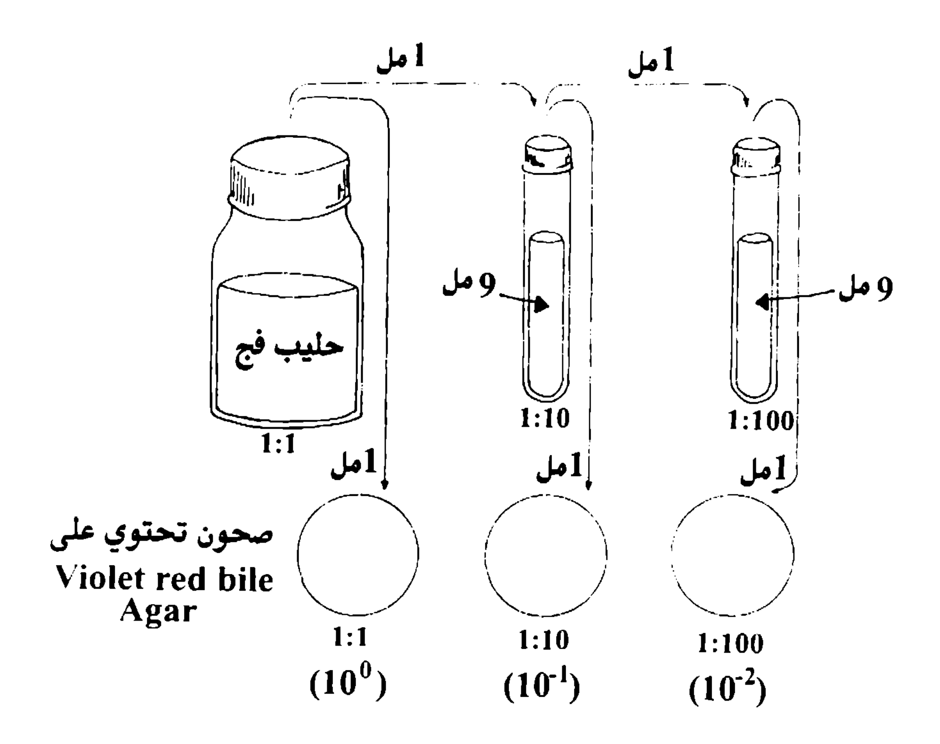
3 . بحذر ضع 1 مل من كل تخفيف ومن الحليب الفج إلى الصحن المناسب.

4 . أضف الأجار المغذي VRBA البارد إلى الصحون الثلاث، ثم حرك كل صحن ثم اتركها لكي يتصلب الأجار.

5 . بعد تصلب الأجار أضف 5 مل أخرى من الأجار لكل صحن، ثم حرك الصحون واتركها لكي يتصلب الأجار.

6 . ضع الصحون في الحاضنة في درجة 32 مئوية لمدة 24 ساعة.

7 . إختر الصحن الذي يحتوي بين 15، 150 مستعمرة التي تكون تحت السطح Subsurface عدسية Lens - shaped وحمراء داكنة Deep Red ومحاطة بهالة قرنفلية ضبابية Hazy Pink Halo. دوّن النتيجة كعدد للخلايا القولونية لكل مل.



شكل (62). سلسلة التخفيفات لتحليل بكتيريا القولون في الحليب الفج Raw Milk

8 . إذا كان هناك حاجة لتأكيد هذه النتيجة confirmation فما عليك إلاً أن تنقل بعض المستعمرات إلى أنابيب تحتوي على الحساء Brilliant Green Bile Lactose Broth ثم ضع هذه الأنابيب في الحاضنة في درجة حرارة 35 مئوية لمدة 24 إلى 48 ساعة.

9 . سجل نتائج هذا التمرين ومناقشة قصيرة حول هذه النتائج.

تمرين (65):

إختبارات اختزال الصبغة Dye Reduction Tests

إختبارات اختزال الصبغة لا تعتبر بديلاً لدراسة بكتيريا القولون ولكن

تستعمل للكشف السريع على كمية الميكروبات في الحليب المراد اختباره؛ فكلما كان عدد الميكروبات كبيراً، كلما أصبح الحليب أسرع إلى الفساد spoilage. إذا استعمل الحليب المحتوي على نسبة عالية من الميكروبات لإنتاج مشتقات الحليب Dairy Products بواسطة التخمر Fermentation فإن هذه الميكروبات ربما تنافس الميكروبات المستعملة في صناعة هذه المشتقات Starter Cultures مما يتسبب في فساد الحليب ونقص في جودة المشتقات.

يوجد اختباران من هذا النوع:

1. إختبار أزرق الميثيلين Methylene Blue Test.

2. إختبار ريزازورين Resazurin Test.

في هذه الاختبارات الصبغة المعايرة Standardized Dye تضاف إلى الحليب المراد اختباره والمحضون في درجة 36 مئوية. الكائنات الدقيقة في الحليب تختزل الصبغة وتزيل اللون عنها Decolorize the Dye. هذا الاختزال ناتج عن النشاط الأيضي لهذه الميكروبات. الوقت اللازم لإزالة اللون من مخلوط الحليب والصبغة Dye - Milk Mixture بواسطة الميكروبات يعتبر مؤشراً لمقدار أو حجم الميكروبات Microbial Load. الحليب قليل الجودة Poor quality (نسبة ميكروبات عالية يزيل اللون بسرعة بينما الحليب الجيد يحتاج إلى عدة ساعات أو أكثر قبل أن يختفي لون الصبغة.

المواد: Materials

- محلول صبغة ريزازورين Standard Resazurin Solution

- حليب فج Raw Milk (في الإمكان استعمال عدة أنواع من الحليب المضافة إليها كميات مختلفة من الميكروبات).

- حمام ماء معدل على درجة حرارة 36 مئوية.

الطريقة : Procedure

1) ضع بواسطة الماصة Pipet 1 مل من محلول صبغة Resazurin في أنبوبة اختبار ذات غطاء برغي Screw - Capped Tube.

2) أضف 10 مل من الحليب الفج إلى الأنبوبة واقفلها بأحكام. أقلب الأنبوبة ثلاث مرات ولكن لا ترجها Do Not Shake.

3) ضع الأنبوبة في حمام الماء المعدل على 36 درجة مئوية مع فتح غطاء الأنبوبة بدورة واحدة فقط One Turn. ضع في حمام الماء أنبوبة أخرى تحتوي فقط على 10 مل من الحليب الفج ومقياس حرارة Thermometer. هذه الأنبوبة الأخيرة تعتبر كشاهد Control. إبدأ في قياس الزمن Start Timing عندما تصل درجة الحرارة 36 مئوية في أنبوبة الشاهد Control.

4) عندما تصل درجة الحرارة 36 مئوية (يجب أن لا تأخذ أكثر من 10 دقائق)، أحكم قفل أنبوبة العينة Sample Tube. أقلب الأنبوبة ثلاث مرات ثم ابدأ في حساب الوقت.

5) إختبر Examine خليط الحَليب والصبغة ساعة واحدة بعد البداية في حساب الوقت. إقرأ تغيير اللون في ضوء النهار Daylight والضوء اللاصف أو الفلوري Fluorescent Light.

6) قارن العينات المختبرة ب Munsell Color Standard 5P7/4 (شكل63). إذا حدث الاختزال بعد هذا المعيار (المخلوط يكون قرنفلياً Pink) فإن الحليب يعتبر صحياً غير جيد للاستعمال.

$$\textit{Resazurin} \xrightarrow{(-O_2)} \textit{Resofurin} \xrightarrow{(-O_2)} \textit{Dihydroresofurin}$$

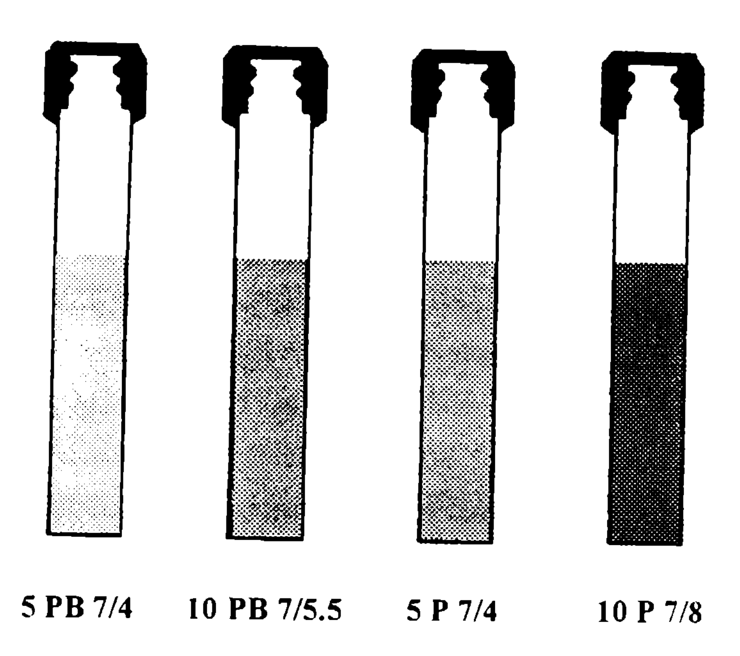
Milk (purple)   Milk(Pink)   (Colorless or White)

أسئلة:

1 . هل يمكن استعمال اختبارات اختزال الصبغة بدل تحليل بكتيريا القولون عند الكشف الجرثومي على الحليب؟ اشرح؟

2 . ما هي قيمة اختبار اختزال الصبغة؟

3 . اشرح كيف يتم اختبار اختزال الصبغة؟



شكل (63). مقياس ألوان Munsell لقياس اختبار إختزال صبغة Resazurin لمدة ساعة واحدة وثلاث ساعات في الحليب. مقياس اللّون 5P7/4 يمثل نقطة النهاية لخليط الحليب مع الصبغة. بعد هذا اللون يعتبر الحليب غير مقبول من ناحية الجودة الصحية (Colomé et al. 1986).

تعيين عدد البكتيريا في الحليب
Quantitative Determination of Bacterial Numbers in Milk

يوجد كثير من الطرق لتحديد عدد البكتيريا في السوائل، بعض من هذه الطرق تعين عدد البكتيريا الحية والميتة، بينما طرق أخرى تحدد فقط عدد الخلايا البكتيرية الحية. في هذا التمرين سوف نتعرف على طريقة عد البكتيريا باستعمال الصحن Plate count أي نحسب فقط الخلايا الحية والتي عندها القدرة على تكوين المستعمرات colonies. وكما نعرف فإن أية خلية بكتيرية حية إذا توفرت لها الظروف الغذائية والفيزيائية تنقسم وتكون مستعمرة.

طريقة تعيين عدد البكتيريا على الصحن Plate count Method عبارة عن طريقة قياسية أو عيارية Standard Method تستعمل في كثير من دول العالم وخاصة في هيئات الصحة العامة Public Health Associations وذلك لتحديد جودة الحليب Quality of Milk. بناء على قانون الصحة العامة Public Health Law فإن الحليب المبستر Pasteurized Milk المسموح ببيعه يجب أن يحتوي على أقل من 30.000 أو (3×10^4) وحدة مكونة للمستعمرة. - Colony Forming unit (cfu) لكل مل. أغلب أنواع الحليب المبستر يحتوي على بكتيريا أقل بكثير من هذا العدد وأغلب هذه البكتيريا غير ممرضة Nonpathogenic، وهذه عبارة عن بكتيريا تتحمل درجات حرارة عالية Thermophilic or Thermoduric Bacteria.

هناك كثير من الأمراض التي تصيب الإنسان عن طريق شرب الحليب الملوث Contaminated milk. تلوث الحليب يأتي من أحد المصادر الآتية:

1. بعض الأبقار تصاب بميكروبات ممرضة. هذه الميكروبات تنتقل إلى الضرع أو ثدي البقرة ومنها إلى الحليب.
2. عدم تنظيف ثدي البقرة قبل عملية الحلب Milking يسبب في نقل ميكروبات جلد البقرة Skin Flora إلى الحليب.

3. عندما تكون حظائر Barns البقر غير نظيفة وبها غبار فإن الميكروبات وخاصة البكتيريا تنتقل إلى الحليب الطازج.
4. أدوات وأواني جمع الحليب غير نظيفة وغير مطهرة بعد استعمالها المرة الأخيرة يسبب في تلوث الحليب.
5. نقص في عملية تبريد الحليب بعد جمعه، حيث أن الحليب الطازج يحتوي على ميكروبات وهذه بدورها تتكاثر بسرعة في درجة حرارة الجو مما يسبب في زيادة عددها وتغيير طعم ورائحة الحليب.
6. طريقة البسترة غير الصحيحة Insufficient Pasteurization.
7. تلوث الحليب المبستر عن طريق بائعيه أو عدم نظافة آلات البسترة.

بعض الأمراض الهامة التي تنقل من البقر المصاب عن طريق الحليب تشمل الآتي:

1. سل البقر Bovine Tuberculosis.
2. Brucellosis
3. Q-Fever
4. إلتهابات بكتيرية Streptococcal Infections

يعطى البقر عادة تطعيمات Vaccines لمنع الإصابة ببعض الأمراض. هناك أمراض أخرى تصيب الإنسان عن طريق تلوث الحليب بسبب عدم نظافة الحيوان، الأجهزة، بائعي الحليب، أو بيئة الحظائر. ومن هذه الأمراض مرض الدفتريا Diphtheria، الكوليرا Cholera، حمى التيفوئيد Typhoid، الديزنتريا Dysentery والحمى القرمزية Scarlet Fever.

قبل البدء في إجراء تمرين تعيين عدد البكتيريا في الحليب، عليك باتباع الاحتياطات precautions الآتية وتطبيقها أثناء إجراء التجربة:

1. تجنب أي تلوث بميكروبات خارجية واستعمل Aseptic Technique عند عمل سلسلة التخفيفات Serial Dilutions.
2. كذلك تجنب التلوث عند استعمال الماصة Pipet في تخفيف وصب

الحليب في صحون بتري المعقمة.

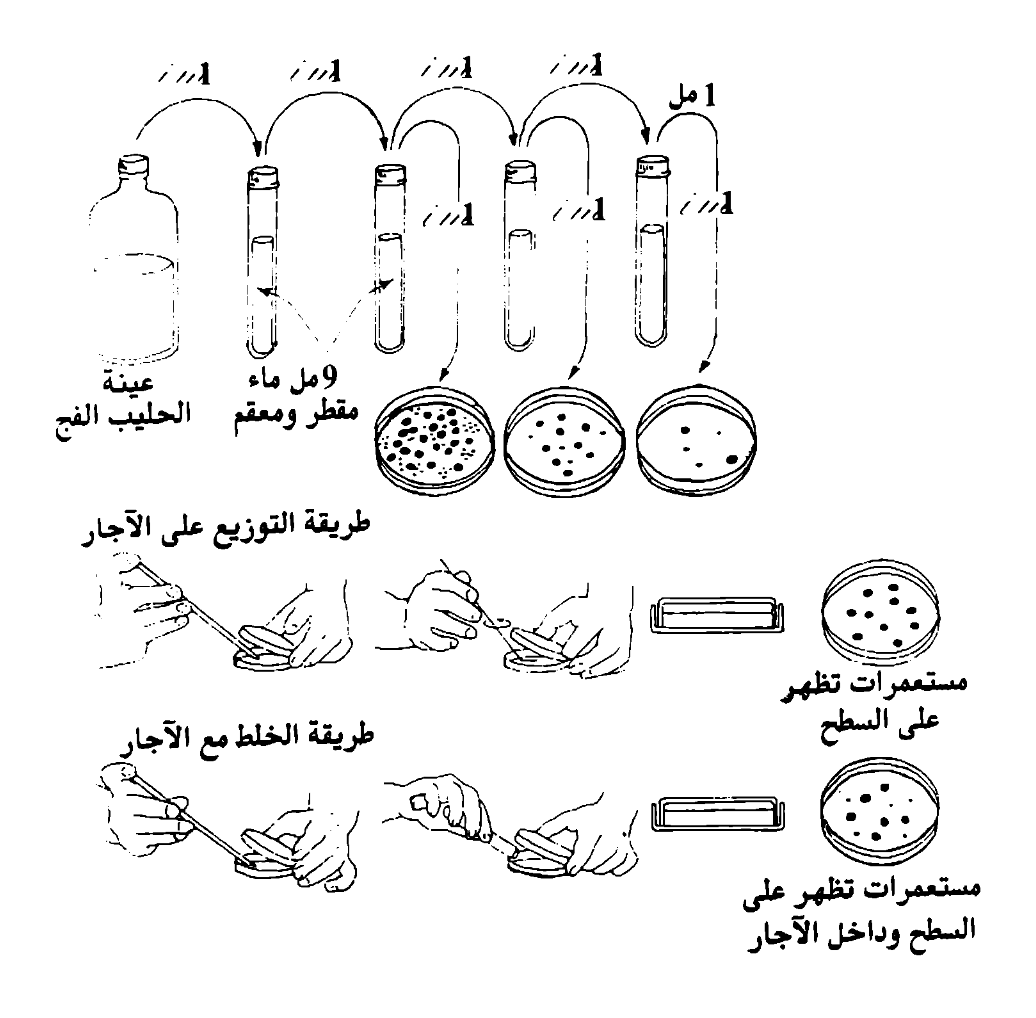
3. حاول استعمال أقل عدد من الماصات لتوفير الماصات ولتجنب نقل كميات إضافية من الحليب إلى سلسة التخفيفات (شكل 64).
4. لا تغمر الماصة في ماء المقارنة Water Blanks عند نقل عينة الحليب أو عينة من التخفيف السابق.
5. لا مانع من أن تلمس مقدمة الماصة الصحن المعقم أثناء النقل.
6. أخلط الحليب جيداً (إلى أعلى وإلى أسفل 25 مرة، على مسافة 12 بوصة). هذا يساعد في توزيع البكتيريا جيداً قبل النقل والزرع في الوسط.
7. رج كل تخفيف Dilution بنفس الطريقة قبل الصب في الصحن وتأكد من أن غطاء Screw cap أنبوبة الاختبار مغلق بإحكام قبل الرج.
8. بعد نقل التخفيفات إلى الصحون المعقمة أضف حوالي 20 مل من الوسط Plate count Agar إلى كل صحن.
9. إستعمل Aseptic Technique عند نقل الوسط إلى الصحون تفادياً من التلوث بميكروبات خارجية.
10. صب أو اسكب صحنين في كل مرة نظراً لأنك تحتاج إلى وقت لخلط التخفيفات في الوسط وهذا يتم بتدوير الصحن على طاولة العمل 20 مرة.

تمرين (66):

تعيين عدد البكتيريا في الحليب المبستر
Quantitative Determination of Bacterial numbers in Pasteurized Milk

المواد : Materials

- حليب مبستر Pasteurized Milk.
- أنابيب اختبار تحتوي على 9 مل ماء مقطر ومعقم (عدد 2).



شكل (64). طرق عد البكتيريا الحية Viable Count Methods

ـ 100 مل من الوسط المغذي والمعقم Plate Count Agar (Standard Methods Agar)

ـ صحون بتري معقمة (عدد 4).

ـ ماصات معقمة حجم 1 مل (عدد 3).

بعد التعقيم إحفظ الوسط المغذي Medium عند حرارة 50 درجة مئوية في حمام مائي Water Bath حتى لا يتصلب.

الطريقة : Procedure

1. ميز (Label) أنبوبتي الاختبار المحتوية على 9 مل من الماء المعقم بالأرقام 1، 2.

2. ميز صحون بتري المعقمة بنفس الطريقة، كل تخفيف يزرع في صحنين على الأقل للحصول على نتائج أكثر دقة عند عد البكتيريا.

3. رج Shake الحليب المبستر جيداً كما جاء في الاحتياطات العامة Precautions.

4. مراعياً الطهارة aseptically أثناء العمل أنقل بالماصة 1 مل من الحليب المبستر إلى أنبوبة التخفيف الأولى (رقم 1)، ثم أبعد الماصة.

5. أخلط هذا التخفيف الأول جيداً، ثم انقل منه 1 مل إلى الصحن المميز بـ 1 : 10، كرر نفس العمل وانقل 1 مل إلى الصحن الثاني.

6. باستعمال نفس الماصة وقبل أن يترسب الحليب إلى قاع الأنبوبة أنقل 1 مل من أنبوبة التخفيف الأولى إلى الأنبوبة الثانية (رقم 2) المحتوية على 9 مل ماء معقم (التخفيف الثاني).

7. رج التخفيف الثاني جيداً ثم انقل منه 1 مل (مكرر) إلى الصحنين المميزين ب 1 : 100 كما عملت في خطوة (5) ثم أبعد الماصة.

8. أضف الوسط المغذي إلى صحنين فقط في كل مرة. حرك الصحن جيداً حتى تفصل الخلايا البكتيرية عن بعضها.

9. أضف الوسط المغذي إلى الصحنين الآخرين وحرك بنفس الطريقة.

10 . أترك الوسط يتصلب في الصحون الأربع.

11. إقلب الصحون وضعها في الحاضنة عند حرارة 30 درجة مئوية ولمدة 48 ساعة.

خلال التدريب العملي القادم سوف تحسب عدد البكتيريا في كل صحن باستعمال جهاز عد البكتيريا Colony Counter (شكل 65). عدد البكتيريا في الحليب المبستر عادة قليل لدرجة أن الصحون غير قابلة للعد Uncountable. خذ في الاعتبار فقط الصحون المحتوية على 30 إلى 300 مستعمرة بكتيرية حتى تقلل من الأخطاء Errors في التقديرات أثناء حساب عدد البكتيريا في كل تخفيف.

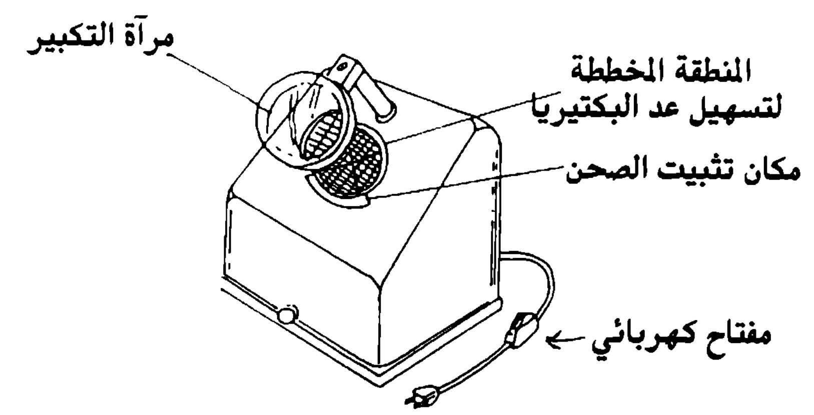
تمرين (67):

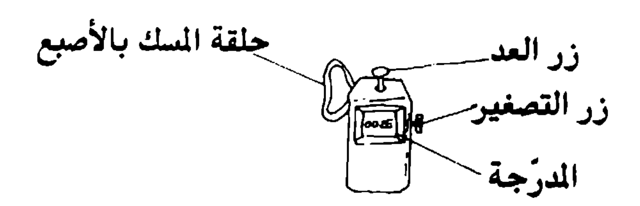
تعيين عدد البكتيريا في الحليب الطازج

Quantitative Determination of Bacterial numbers in Raw Milk

المواد: Materials

- حليب طازج Raw Milk





شكل (65). جهاز عد المستعمرات البكتيرية Quebec Colony Counter مع آلة تسجيل المستعمرات Tally Rigester.

- زجاجات تحتوي على 99 مل من الماء المقطر والمعقم (عدد 2)
- 125 مل من الوسط المغذي المعقم Sterile Plate count Agar
- صحون بتري معقمة (عدد 6).
- ماصات معقمة حجم 1 مل (عدد 3).

الطريقة: Procedure

أجرِ نفس طريقة التخفيف التي استعملتها أثناء التمرين (66) على

الحليب المبستر. إتبع الخطوات كما في الشكل (64) وهي تتلخص في عمل التخفيفات ووضعها في الصحون، إضافة الوسط المغذي، خلط الحليب المخفف مع الوسط المغذي، ترك الوسط يتصلب، قلب الصحون، وأخيراً وضعها في الحاضنة في 30 درجة مئوية لمدة 48 ساعة.

حساب عدد البكتيريا في الحليب

Calculation of numbers of Bacteria in Milk

1. أي صحن يحتوي على أقل من 30 مستعمرة أو أكثر من 300 مستعمرة يلغى ولا يحسب.

2. عد البكتيريا في الصحنين وخذ المتوسط The Average.

ملاحظة هامة: بناء على مقاييس الصحة العامة، الفرق في عدد المستعمرات بين صحنين بنفس التخفيف يجب ألا يتعدى 10 مستعمرات.

3. إضرب Multiply المتوسط في عامل التخفيف Dilution Factor (فمثلاً عند التخفيف 1:100 يكون عامل التخفيف 100) نتحصل على عدد الوحدات المكونة للمستعمرات لكل مل - Colony Forming Unit/ml.

كما نلاحظ في الشكل (64) بالنسبة للحليب غير المبستر (الطازج) يكون عامل التخفيف كبيراً وهذا مطلوب للحصول على تخفيفات تحتوي بين 30 و300 مستعمرة. من نتائج عدد البكتيريا في الحليب المبستر والطازج تستطيع أن تحدد صلاحية الحليب للاستعمال من عدمه.

أسئلة:

1 . لماذا تعتبر طريقة عد البكتيريا في الحليب باستعمال الصحن Plate count دقيقة وجيدة؟

2 . ما هي أسباب تلوث الحليب بالميكروبات؟

3 . لماذا قمت بتخفيف الحليب عدة مرات قبل إجراء تمرين عد البكتيريا في الحليب؟

4 . لماذا يفضل عد المستعمرات البكتيرية فقط التي تتواجد بين 30 إلى 300 مستعمرة على كل صحن؟

5 . كيف توصلت إلى معرفة عدد الوحدات المكونة للمستعمرات في كل مللتر من الحليب المراد دراسته؟

الباب الثامن

بكتيريا التربة

Soil Bacteriology

تمرين (68):

عزل بكتيريا منتجة للأبواغ من التربة

Isolation of Endospore Formers from Soil

بعض أجناس البكتيريا وخاصة أنواع من أجناس **Bacillus, Clostridium** تكوّن أثناء دورة حياتها جسماً ساكناً Dormant structure له القدرة على مقاومة درجات الحرارة العالية يسمى بوغ Endospore. هذا التركيب Structure تنتجه البكتيريا عندما تصبح الظروف البيئية حول الخلية البكتيرية غير ملائمة للنمو الخضري Vegetative growth. في هذه الحالة تجند الخلية كل نشاطاتها الكيموحيوية Biochemical لأجل تكوين البوغ الذي بدوره يحمل نسخة طبق الأصل من العامل الوراثي للنوع البكتيري Species Genome.

البكتيريا المنتجة للأبواغ تعزل بطريقة بسيطة من أية بيئة. العينات تحتاج فقط إلى التسخين لدرجة حرارة معينة عندها تموت كل الخلايا الخضرية Vegetative cells وتبقى الأبواغ المقاومة لهذه الحرارة.

المواد: Materials

- صبغات جرام Gram stain reagents

ـ صبغة المالاكايت Malachite green stain

ـ أجار عد المستعمرات Plate count Agar

ـ أجار تكوين الأبواغ Sporulating Agar

ـ عينات تربة Soil Samples

ـ أنابيب تحتوي على 9 مل ماء معقم

ـ زجاجات تحتوي على 99 مل ماء معقم

ـ حمام ماء ساخن درجة 80 مئوية Water Bath

ـ حاضنة (30C°).

الطريقة: Procedure

1. أضف 11 جرام من التربة إلى الزجاجة المحتوية على 99 مل من الماء المعقم. هذا يعني تخفيف 1:10 أو (10^{-1}).

2. سخن هذا التخفيف لمحلول التربة (10^{-1}) في درجة حرارة 80 لمدة 15 دقيقة. تأكد من أن درجة الحرارة تثبت عند 80 درجة مئوية قبل البدء في حساب الزمن.

3. إعمل سلسلة من التخفيفات حتى التخفيف 10^{-5}.

4. ضع 1 مل من 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} في صحون بتري (صحنان لكل تخفيف).

5. أضف الاجار المنصهر والبارد Plate counting Agar

6. حرك الصحون عدة مرات في حركة دائرية على الطاولة (من أجل خلط محلول التربة والأجار).

7. أترك الأجار حتى يتصلب، ثم أقلب الصحون وضعها في الحاضنة في درجة 30 مئوية لمدة 48 ساعة.

8. إحسب عدد الأبواغ لكل جرام تربة.

9. أصبغ بصبغة جرام المستعمرات السائدة.

10. في حالة الحصول علي بكتيريا عصوية موجبة لصبغة جرام. إزرع على أجار منتج للأبواغ Sporulating Agar.

11. ضع الصحون في الحاضنة لمدة 48 ساعة ودرجة حرارة 30 درجة مئوية.

12. قم بعملية صبغ أبواغ المستعمرات المتواجدة على الأجار المنتج للأبواغ. لاحظ وضع Position الأبواغ داخل الخلايا التي لم تتحلل بعد.

تمرين (69):

عزل ميكروب منتج لمضاد حيوي من التربة

Isolation of Antibiotic Producer from Soil

التربة تحتوي على عدد كبير من الميكروبات التي تنتج مركبات تكبح نمو أو تقتل كائنات حية دقيقة أخرى، هذه المركبات تعرف بالمضادات الحيوية Antibiotics. نمط الفعل أو العمل Mode of Action لهذه المضادات الحيوية على الميكروبات يختلف من مضاد حيوي إلى آخر. بعض من هذه المضادات يكبح تكوين جدار الخلية Cell wall، بينما مضادات حيوية أخرى يمكن أن تؤثر على DNA, RNA، أو تكوّن وظيفة البروتينات. بعض المضادات الحيوية تؤثر فقط على الكائنات الحية ذات النواة البدائية Procaryotic Organisms وأخرى تؤثر فقط على الخلايا الراقية Eucaryotic cells. بعض المضادات الحيوية تؤثر على النوعين من الخلايا. بعض المضادات الحيوية تستعمل في العلاج بينما أخرى تعتبر سامة وذات تأثيرات جانبية على الإنسان والحيوان ولا تستعمل.

المواد: Materials

ـ مزارع على الأجار المائل Slant Cultures لأنواع البكتيريا التالية:

Streptomyces sp. (actinomycete) عزلت من التربة

Escherichia coli

Staphylococcus aureus

Pseudomonas fluorescens

ـ الوسط المغذي Plate Count Agar (PCA)

ـ حاضنة بدرجة حرارة 30C°.

الطريقة: Procedure

1. إزرع بواسطة خط واحد بكتيريا Streptomyces وهي Actinomycete عزلت من التربة سابقاً، وذلك مبتدئاً من أعلى إلى أسفل في مركز صحن الأجار المغذي PCA، ثم ضع الصحن المزروع على درجة 30 مئوية حتى يظهر النمو (5 أيام أو أكثر). بكتيريا Actinomycete تنمو ببطء وتحتاج إلى مدة أطول حتى تنتج مضادات حيوية قبل أن تزرع بقية البكتيريا المذكورة أعلاه والتي تعتبر سريعة النمو.

2. بعد أن يظهر نمو بكتيريا Actinomycete إزرع بقية البكتيريا كما هو مبين في شكل (66).

3. ضع الصحن مرة أخرى في الحاضنة في 30 درجة مئوية لمدة 24 ساعة إلى 48 ساعة.

4. لاحظ إذا ما كان هناك كبح Inhibition في نمو البكتيريا بواسطة ما تنتجه Actinomycete.

تذكر أي من البكتيريا موجبة وأي منها سالبة لصبغة جرام.

أسئلة :

1. ما فائدة البوغ Endospore للبكتيريا التي تنتجه؟
2. ما أهمية موقع البوغ داخل البكتيريا لعلماء الأحياء الدقيقة Microbiologists؟
3. عرف المضاد الحيوي Antibiotic.
4. لماذا تعتبر المضادات الحيوية اختيارية Selective في تأثيرها على الخلية؟

شكل (66). طريقة التخطيطات التقاطعية لعزل البكتيريا المنتجة للمضادات الحيوية

الباب التاسع

الدراسات المعملية لبعض الكائنات الحية الدقيقة الأخرى

Characteristics of Other Selected Microorganisms

الخمائر

Yeast Fungi

الفطريات Fungi تشمل الخمائر yeast، العفن Molds، الفطر Mushrooms، الغاريقون Toadstools، السناج Snuts، والصدأ Rusts. مملكة الفطريات Kingdom of Fungi تضم عدداًع كبيراًع من الكائنات التي اعتبرت في الماضي نباتات بالرغم من عدم احتوائها على مادة اليخضور Chlorophyll وجذور Roots وسيقان Stems و أوراق Leaves. هذه الكائنات تختلف في الأحجام والتعقيد، من خمائر ذات خلية واحدة one - celled yeasts إلى العفن الخيطي Filamentous Molds إلى الفطر المعقد Complex Mushrooms.

الخمائر تتكاثر لاجنسياً asexually عن طريق التبرعم Budding. الخلية البرعم Budding Daughter cell تبدأ كنتوء أو بروز Protrusion من الخلية الأم Mother cell.

قبل نضوج الخلية البرعم تنتقل كمية متطابقة من العامل الوراثي DNA

من الخلية الأم إلى الخلية البرعم نظراً لأن هذا انقسام فتيلي أو غير مباشر Mitotic Division مما يدل على أن الخلية الأم والخلية البرعم لهما نفس الصفات الوراثية. بعد الانفصال الكامل من الخلية الأم تظهر الخلية البرعم صغيرة في الحجم مما يدل على عدم انقسام متساوٍ في السيتوبلازم، علماً بأن في الانقسام البكتيري Bacterial Fission يحدث انقسام متساوٍ في السيتوبلازم. بعض الخمائر والعفائن تتكاثر جنسياً أيضاً، وهذا يحدث عن طريق الاقتران Conjugation واندماج النواة لخليتين مختلفتين.

المواد: Materials

- أنابيب اختبار ذات غطاء لولبي (برغي).
- ماصات 10 مل.
- عصير عنب.
- صحون بتري محتوية على الوسط Sterile Sabouraud Dextrose Agar
- مزارع سائلة للخمائر **Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans**

تمرين (70):

دراسة الصفات المجهرية والمزرعية للخمائر

Microscopic and cultural characteristics of yeast fungi

الطريقة: Procedure

1. باستعمال المزارع السائلة للخمائر المذكورة أعلاه إزرع بطريقة المسح Streaking كل نوع على صحن بتري يحتوي على الوسط SDA. لا تنسَ أن ترج المزارع السائلة قبل استعمالها.

2. ضع الصحون المزروعة في الحاضنة في درجة 37 مئوية لمدة 48 ساعة.

3. إفحص شكل المستعمرات واعمل رسومات لعدة مستعمرات.

4. أكتب ملاحظاتك حول هذه المستعمرات وقارنها ببعضها وبالمستعمرات البكتيرية التي سبق لك أن درستها.

5. خذ قطرة من كل مزرعة سائلة وادرس الخميرة حية بطريقة Wet Mount.

6. إعمل رسومات لخلايا الخميرة. لا تنسَ أن ترسم بعضاً من خلايا الخميرة وهي في حالة تبرعم **Budding**.

7. قارن بين أنواع الخميرة التي استعملتها واكتب ملخصاً حول ما تشاهده تحت المجهر.

تمرين (71):

دراسة الفروق الفيزيولوجية للخمائر النامية في عصير العنب

Physiological Differences of yeast fungi when grown in Grape Juice

الطريقة : Procedure

1. ضع بعناية 10 مل من عصير العنب في أنبوبتي اختبار ذات الغطاء اللولبي
2. إزرع بإبرة التلقيح إحدى الأنابيب بخميرة **Candida albicans** والأخرى بخميرة **Saccharomyces cerevisiae**. تأكد من وضع غطاء الأنبوبة بأحكام.
3. ضع الأنبوبتين في الحاضنة في درجة حرارة 30 مئوية لمدة 48 ساعة لا أكثر.
4. بعد التحضين إبحث عن فقاعات من غاز ثاني أكسيد الكربون قبل فتح الأنبوبة.

5. إفتح الأنبوبة وابحث عن الغاز واستشم رائحة الكحول وقارن بين الاثنين.

بعض الدراسات المعملية للفطريات الخيطية
Laboratory Studies on Filamentous Fungi

العفن mold يعتبر من أكبر الكائنات المدروسة في علم الأحياء الدقيقة. دراستها عادة لا تحتاج إلى طرق الصبغ أو دراسات كميوحيوية Biochemical نظراً لأن الاختلافات التركيبية عادة تظهر مجهرياً بوضوح عندما لا يوجد تلف في المستعمرات الفطرية. في هذا الجزء من العملي نزرع الفطريات على شرائح Slide cultures من أجل وضعها مباشرة تحت المجهر ودراستها. الفروق في التركيب التي تعتبر هامة جداً في تشخيص الفطريات الخيطية تشمل الأنواع المختلفة للأبواغ Spores كذلك تنظيم أو ترتيب هذه الأبواغ وكذلك الهيفات Hyphae.

العفن Mold يسمى أيضاً بالفطريات الخيطية Filamentous Fungi من أجل تفريقها عن فطريات الخمائر yeast fungi. هذه الأعفان Molds تملك عادة مستعمرات ذات حجم خفيف، كبير وزغبي بسبب وجود الهيفات Hyphae والميسيليا Mycelia والأجزاء المثمرة Fruiting Heads.

المواد: Materials

- مزرعة للفطر **Rhizopus**
- مزرعة للفطر **Penicillium**
- كلا المزرعتين على الوسط 7 Day old Sabouraud Slant Cultures
- صحون بتري (عدد 2) معقمة وتحتوي على قضيب زجاجي منحني وشريحة مجهرية.

- ماء معقم (25 مل) في قنينة ذات غطاء لولبي أو مسدودة بالقطن (عدد 2).
- غطاء شريحة (عدد 2).
- كوب صغير يحتوي على كحول Isopropyl.
- قابض شرائح.
- صحون بتري تحتوي على Sterile Sabouraud Dextrose Agar (عدد 2).
- الوسط Sterile Sabouraud Dextrose Agar (50 مل).
- صبغة Lactophenol Cotton Blue.
- زجاجة تقطير Bottle Dropper.

تمرين (72):

طريقة تحضير مزرعة مصغرة باستعمال الفطر ريزوبوس

Procedure for Preparing Microculture Using **Rhizopus** sp.

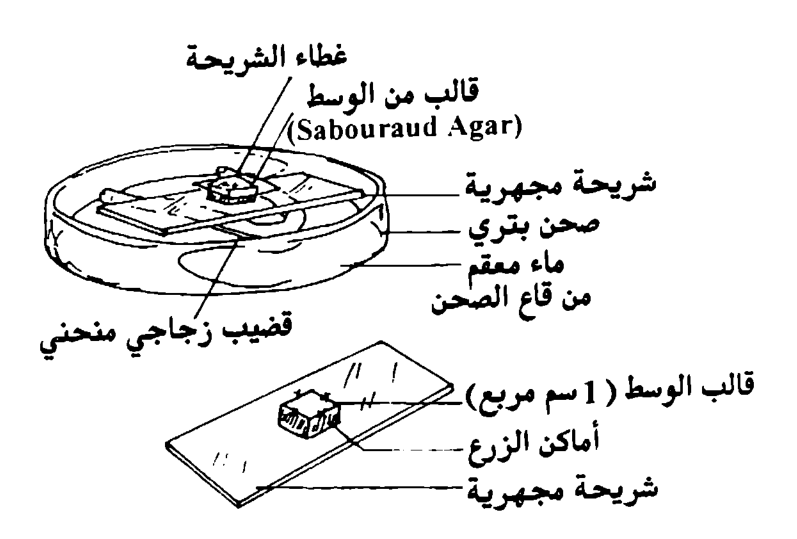
1. أسكب الوسط SDA في صحن بتري معقم واتركه ليتصلب، ونظراً لأنك سوف تقطع هذا الأجار إلى قطع صغيرة لذا حضر طبقة غليظة من الأجار.
2. دع زميلك يشاركك لأنك تحتاج فقط إلى قالبين صغيرين من الأجار 2 Small Agar Blocks.
3. تأكد من أن الشريحة المجهرية في وضع معتدل فوق القضيب الزجاجي المنحني كما في شكل (67).
4. الآن إقطع قالباً من SDA بحيث يكون على شكل مربع طول ضلعه واحد

سم (1 سم) وذلك بواسطة إبرة التلقيح المعقمة.

5. إرفع قالب الأجار فوق الشريحة باستعمال إبرة التلقيح أو مشرط معقم Flamed Scalpel.

6. بعد أن وضعت قالب الأجار على الشريحة المجهرية، إزرع كل الجوانب العليا لقالب الأجار بفطر **Rhizopus** كما في شكل (67).

7. عقّم غطاء الشريحة عن طريق غمرها في الكحول المركز absolute Isopropyl alcohol وتعريضها للهب.



شكل (67). تحضير المزرعة المصغرة Microculture مع توضيح أماكن الزرع

8. ضع غطاء الشريحة المعقم فوق قالب الأجار المزروع بالفطر. بعض الهيفات Hyphae تنمو خارج قالب الأجار وتلتصق بالجانب السفلي لغطاء الشريحة ويمكن دراستها بسهولة تحت المجهر.

9. أسكب حوالي 5 إلى 10 مل من الماء المعقم في قاع صحن المزرعة المصغرة Microculture Plate حتى لا يتعرض قالب الأجار إلى الجفاف أثناء مدة الحضانة الطويلة. خذ حذرك ولا تسكب الماء فوق قالب الأجار أو الشريحة أو غطائها.

10. أعد غطاء صحن بتري. المزرعة المصغرة متكاملة الآن ويمكن وضعها في الحاضنة.

11. ضع المزرعة المصغرة في الحاضنة في وضعها العادي Right side up في درجة حرارة الغرفة لمدة أسبوع واحد. عندما ينقص الماء بالتبخر في قاع الصحن يمكن تعويضه بماء معقم. بعد انتهاء مدة الحضانة خذ الشريحة بحذر وضعها تحت المجهر (الشريحة بالكامل بما عليها أي قالب الأجار وغطاء الشريحة)، ثم أبعد أية رطوبة Moisture من أسفل الشريحة.

12. باستعمال القوة الصغرى (× 10) والكبرى (× 40) إفحص الهيفات Hyphae، التركيبات المثمرة Fruiting structures، والأبواغ Spores وشبه الجذيرات Rhizoids إذا تواجدت. الذي يمكن رؤيته يظهر واضحاً في شكل (68)، ثم إعمل رسومات واكتب ملاحظاتك حول ما تشاهده تحت المجهر عن التركيبات المختلفة للفطر.

تمرين (73):

طريقة تحضير مزرعة مصغرة لفطر البنسيليوم Microculture of **Penicillium**

أعد نفس الخطوات التي اتبعتها في التمرين السابق (تمرين رقم 72) باستعمال فطر **Penicillium** بدل فطر **Rhizopus**، ثم ارسم واكتب البيانات على الرسم. أنظر إلى شكل (68).

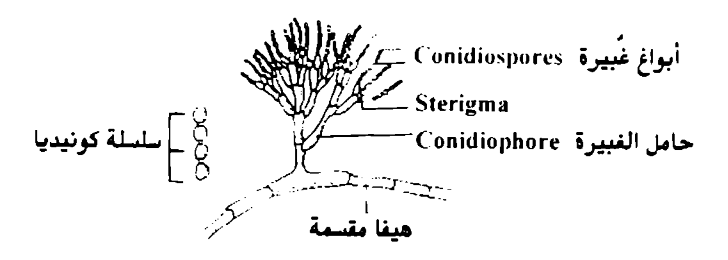
تمرين (74):

دراسة المزرعة المصغرة باستعمال الصبغة:

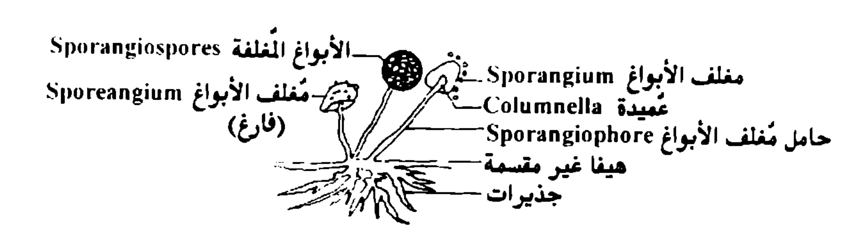
Microculture Cover Slip wet mount Using Lactophenol Cotton Blue (LCB)

تتبع الخطوات التالية في تحضير Lactophenol Cotton Blue Wet Mount:

1. ضع قطرتين من Lactophenol Cotton Blue على شريحة مجهرية نظيفة.
2. أبعد بإصبعك غطاء الشريحة من على قالب أجار المزرعة المصغرة (التمرينان السابقان) Microculture Agar Block. أمسك غطاء الشريحة من الحافة.
3. ضع غطاء الشريحة مع الفطر ملتصقاً بها على سطح قطرات Lactophenol Cotton Blue على الشريحة. لتجنب فقاعات هوائية تحت الغطاء أدخل أحد أطراف الغطاء في قطرة الصبغة (LCB)، ثم أدخل بقية الغطاء في القطرة.
4. تذكر بأن الفطر Fungus متعلق بغطاء الشريحة. إفحص القطرة المبللة Wet Mount بدقة، أولاً بالعدسة الصغرى (× 10) ثم بالعدسة الكبرى (× 40).
5. كرر هذه التجربة مستعملاً كلا الفطرين وارسم التراكيب المختلفة واكتب بياناتك على الرسومات.



Penicillium notatum



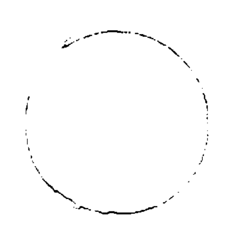
Rhizopus sp.

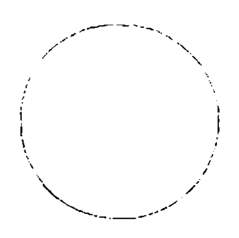
شكل (68) جنسان من الفطريات غير الممرضة Nonpathogenic

تمرين (75):

دراسة الشكل العام للمستعمرة Gross Colonial Morphology

1. إزرع الفطرين بطريقة النقطة الواحدة Single Dot على صحون بتري تحتوي على SDA كما في شكل (69).
2. ضع صحون بتري المزروعة في وضعها العادي في درجة حرارة الغرفة لعدة أيام ثم اكتب ملاحظاتك عن المزرعتين.





Rhizopus sp. **Penicillium sp.**

شكل (69). الزرع بطريقة النقطة الواحدة على الوسط Sabouraud Dextrose Agar

دراسة بعض الحيوانات الأولية (الطفيليات)
Protozoans: Sarcodines, Flagellates, and Ciliates

الطفيليات Parasites إما أن تحتوي على خلية واحدة one - celled animals (Protozoans) One - أو متعددة الخلايا Multicellular animals (Metazoan). علم الطفيليات Parasitology يشمل دراسة الحيوانات الأولية Protozoans، كذلك الديدان Parasitic Worms والمفصليات Arthropods مثل القمل Lice والسوس mites والقراد ticks. الديدان الطفيلية والمفصلية تعتبر حيوانات متعددة الخلايا.

جدول (10) يبين بعضاً من هذه الحيوانات الأولية غير المتطفلة أي حرة المعيشة Free - living. كذلك يوضح بعض الطفيليات Parasites. شكل (70) يوضح التركيبات الخلوية لهذه الحيوانات. بعض من هذه الحيوانات لها أهمية طبية ومعملية.

المواد: Materials

ـ مزارع حية من **Amoeba Proteus, Euglena gracilis, Paramecium caudatum**

ـ لطخات مصبوغة من: **Entamoeba histolytica** cysts

Trichomonas hominis trophozoites, Giardia lamblia cysts or trophozoites **Balantidium coli** cysts

لطخات دم من **Trypanosoma gambiense, Plasmodium** أو أي نوع آخر من **Trypanosoma**.

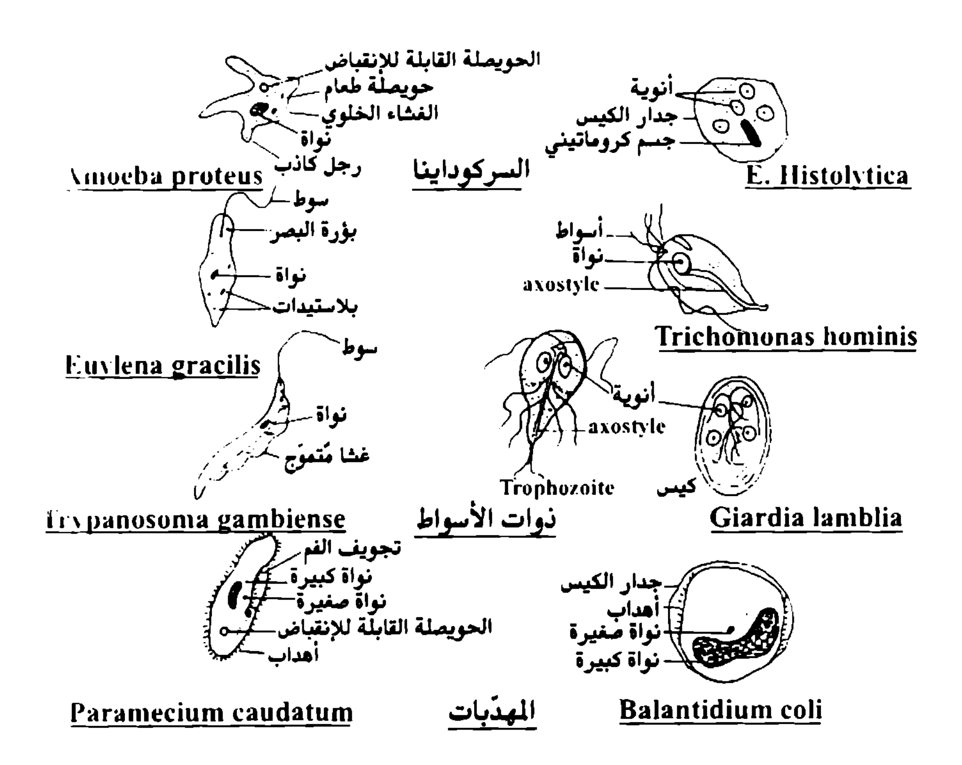
- شرائح مجهرية نظيفة Microscope slides.
- أغطية شرائح Cover glasses.
- دهن Vaseline.
- عيدان أسنان Tooth picks.
- methylcellulose أو Protoslo.

تمرين (76):

دراسة الأميبة سركوداينا (Sarcodina (Rhizopoda

الطريقة : Procedure

1. حضر عينة حية بواسطة طِريقة القطرة المبللة Wet Mount عند مرحلة Trophozoite للحيوان الأولي **Amoeba proteus**.
2. إبحث باستعمال العدسة الصغرى (× 10) موقع الكائن الحي الأميبة Amoeba تحت المجهر. بالعدسة الصغرى تظهر الأميبة على شكل كتلة من مادة حبيبية Mass of granular Material. بعض الأحيان يتطلب منك عمل عدة تكرارات لطريقة Wet Mount قبل العثور على الأميبة.
3. بعد العثور على الأميبة إجعلها في مجال المجهر ثم غير إلى العدسة الكبرى (× 40).



شكل (70) تعريف بعض الحيوانات الأولية **Protozoa** بواسطة تركيبات الخلية

جدول (10). ملخص للصفات الهامة للحيوانات الأولية Protozoon

Class	Classification characteristics	Free – living nonparasitic representative	Parasitic representative	Portal of entry or mode of entry	Parasitic condition in humans	Specimen of choice for identification of parasite
Sarcodina	Locomotion-pseudopods	Amoeba proteus	Entamoeba histolytica	Ingestion of Cysts	Amoebic dysenteery	Fresh stool
Mastigophora	Locomotion – Flagella	Euglena Gracilis	Trichomonas Hominis (T. vaginalis)	Fecal contamina – tion of the vagina or sexual intercourse	Vulvo – Vaginitis	Vaginal discharge Urethral discharge
			Giardia lambia	Ingestion of Cysts	Enterits And Diarrhea	Fresh stool
			Trypanosoma Gambiense Or any Trypanosomal Species	Bite of insect Vector (tsetes)	African Sliping Sickness	Blood smear
Ciliata	Locomotion-cilia	Paramecium caudatum	Balantidium Coli	Ingestion of Cysts	Recurrent Diarrhea Alternating With consti – pation	Fresh stool
Sporozoa	No locomotor Organelles Multiply by Forming spores Complex life Cycle	None	Plasmodium Sp.	Bite of Insect Vector	Malaria	Blood smear

4. إبحث عن التركيبات المختلفة مثل الأرجل الكاذبة Pseudopods، البروتوبلازم المندفعة Streaming protoplasm، النواة Nucleus، الفراغات ذات الانقباض Contractile Vacuole والأكياس الغذائية Inclusions.

5. إعمل رسومات للتروفوزيت Trophozoite مبيناً اتجاه حركة البروتوبلازم واكتب ملاحظاتك عن هذا الكائن الحي.

6. بعد ذلك إفحص اللطخة المصبوغة للنوع الممثل لهذا الكائن وهو **Entamoeba histoloytica**. إرسم ما أمكن من التفاصيل حول أكياس Cysts هذا الكائن الحي مستعملاً العدسة الزيتية وارجع إلى شكل (70) في تعريف التركيبات المختلفة. تذكر بأن التروفوزويت Trophozoite لهذه الأميبة **E. histoloytica** هو الذي يهاجم الغشاء المخاطي Mucosa الخاصة بالأمعاء الغليظة large intestine مما ينتج عنه قرحات Ulcers والتي تكون مصحوبة بمرض الديزنتيريا Dysentery. مرحلة Trophozoits وكذلك كرات الدم الحمراء Red Blood cells تتواجد في هذه الحالة في السائل البرازي. كذلك في حالات نادرة يحدث مرض في الكبد.

7. إرسم الأكياس الطفيلية Parasitic cysts واكتب وصفاً كاملاً عن المرض الذي تسببه.

تمرين (77):

دراسة المستيقوفورا Mastigophora

الطريقة: Procedure

1. حضر عينة حية بطريقة Wet Mount لطفيل يوقلينا **Euglena** في مرحلة Trophozoites بإضافة قطرة من المزرعة إلى قطرة من Protoslo.

يوقلينا تتحرك بسرعة كبيرة عن طريق الأسواط Flagella. محلول Protoslo يخفض من سرعة هذا الكائن الحي حتى يمكن الإحتفاظ به في المجال واستمرار رؤيته تحت المجهر.

2. إبحث وبصفة خاصة عن السوط Flagellum والكلوربولاست Chloroplasts. يوقلينا تعتبر مرحلة انتقال Transitional organism تربط مملكة النبات ومملكة الحيوان نظراً لأنها تملك صفات من الاثنين.

3. إرسم ما ترى تحت المجهر واكتب بياناتك على الرسم.

4. أدرس شرائح مصبوغة أو لطخات دم مثبتة لأنواع أخرى من الطفيليات (أنظر المواد)، وارسم ما ترى تحت المجهر موضحاً البيانات على الرسم.

تمرين (78):

دراسة المهدب Ciliata

الطريقة: Procedure

1. حضر عينة على شريحة بطريقة Wet Mount من مزرعة حية للباراميسيوم **Paramecium** كما في العملي السابق.

2. أدرس تركيبات هذا الكائن الحي تحت المجهر، كذلك حركة هذا الكائن الذي يعتبر من ضمن الحيوانات الأولية ذات الأهداب Ciliated protozoans وغير الممرضة Nonpathogenic.

3. إرسم هذا الكائن الحي واكتب بيانات عن التركيبات المختلفة. يمكن استعمال بعض الشرائح المصبوغة ودراستها تحت العدسة الزيتية.

4. أدرس أكياس Cysts للكائن الحي **Balantidium coli** الذي يعتبر الطفيل الوحيد ضمن هذه المجموعة الذي يسبب أمراضاً للإنسان Parasitic

ciliate of Humans وهو يعتبر أكبر طفيل في الحيوانات الأولية. ارسم هذا الطفيل واكتب البيانات على الرسم.

تمرين (79):

دراسة طفيل الملاريا في لطخات دم مصبوغة:

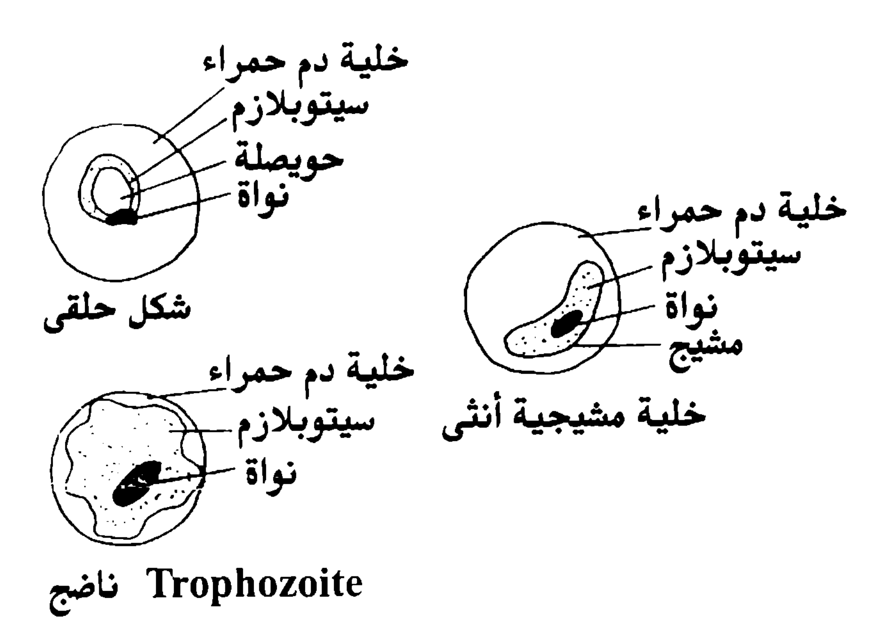
Examination of the Malaria Parasite in stained blood Smear

الكائنات الحية من صنف البروتوزوا Protozoa تعتبر طفيليات إجبارية Obligate Parasites، لهذا لا يوجد أنواع حرة المعيشة Free-living لدراستها. بلازموديا Plasmodia وهي الحيوانات الأولية المسببة لمرض الملاريا Malaria تمتلك دورة حياة معقدة تتم داخل عائلين مختلفين. هذه الطفيليات تمتلك دورة حياة جنسية Sexual cycle حيث تتكون فيها جراثيم spores وكذلك دورة حياة لاجنسية Asexual cycle. الدورة الجنسية تتم في الأمعاء gut وجدار البطن Abdominal Wall لأنثى بعض أنواع البعوض Mosquitoes جنس الأنوفولس **Anopheles**. الدورة اللاجنسية تتم في الكبد Liver وخلايا الدم الحمراء Erythrocytes للإنسان Humans وتسبب أعراض المرض. يوجد عدة أنواع (على الأقل 5) لجنس البلازموديوم **Plasmodium** التي تسبب الملاريا. بعض من هذه الأنواع هي: **Plasmodium vivax, Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae**. من أجل بقاء الملاريا كمرض مستوطن Endemic يجب على هذا الطفيل أن يستكمل الدورتين هاتين.

الطريقة: Procedure

1. تفقد لطخة دم مصبوغة stained blood Smear لدراسة المراحل المختلفة لطفيل البلازموديوم **Plasmodium** كما هو موضح في شكل (71). إستعمل العدسة الزيتية نظراً لأنك تبحث عن هذه المراحل داخل خلايا الدم الحمراء وتحتاج إلى تكبير أعلى.

2. إعمل عدة رسومات، الشكل الحلقي The Ring form هو أكثر المراحل تواجداً، وربما تجد مراحل أخرى للطفيل.



شكل (71). رسم تخطيطي لمراحل دورة حياة طفيل Plasmodium غالباً مشاهدتها في لطخات الدم.

دراسة بعض الشريطيات (المسطحات) Platyhelminths

شعبتان two phyla من الديدان لهما أهمية طبية لأنهما تحتويان على أجناس تعتبر طفيليات في الإنسان. بعض من شعبة الشريطيات Platyhelminths (tapeworms) تسبب الإصابة بالديدان المثقبة والشريطية Fluke and Tapeworm infestations. الديدان المدورة Roundworm والتي تسبب عدة إصابات Infestations وضعت في طائفة النيماتودا Class Nematoda لشعبة أسكهلمنث Phylum Aschelminths. الاسم العام لكل هذه الديدان الطفيلية هي الديدان المعوية Helminths.

في هذه التمرينات العملية في علم الشريطيات سوف نتعرف على الديدان الطبية الهامة مثل The Chinese Liver Fluke (**Clonorchis sinensis**) حيث إصابتها للإنسان معروفة جداً.

الديدان المعوية متعددة الخلايا Metazoans بعض منها كبير الحجم ولها أهمية في علم الأحياء الدقيقة Microbiology لأن تشخيص الإصابات بهذه الديدان في معامل العيادات عادة تتم عن طريق الفحص المجهري Microscopic Examination لعينات البراز Stool، السوائل من الجسم Body Fluids أو الأنسجة Tissue (Biopsy) وذلك للبحث عن بيض ova أو يرقات Larvae هذه الطفيليات (جدول 11).

المواد : Materials

- شرائح محضرة من: **Clonorchis sinensis** Adult.
- **Clonorchis sinensis** ova.
- **Taenia Saginata** Composite Adult
- **Taenia solium** ova
- **Taenia solium** Cysticercus.
- **Echinococcus granulosus** Adult.
- **Echinococcus granulosus** ova.
- Hydatid sand.
- **Taenia Saginata** ova
- **Taenia solium** composite Adult.
- عينات محفوظة للديدان متكاملة النمو Adults.

تمرين (80):

دراسة دودة الكبد الصينية The Chinese Liver Fluke (Clonorchsis)

دودة الكبد الصينية تعيش في القناة الصفراوية Bile Duct والمرارة Gall Bladder وقنوات البنكرياس Pancreatic Duct للإنسان حيث تسبب التحلل الصفراوي Biliary Cirrhosis واليرقان Jaundice. الديدان الناضجة Adults يبلغ طولها 20 مم وعرضها 4 مم. غزو الإنسان بهذه الديدان Human Infestation يبدأ عندما يبتلع الإنسان اليرقات Larvae والتي تسمى في هذه الحالة Metacercaria عن طريق أكل سمك المياه العذبة الطازج Raw أو غير المطبوخ جيداً Undercooked. بعد أكلها مباشرة تتحرك هذه اليرقات إلى القناة الصفراوية حيث تصبح دودة ناضجة Adult Fluke. كلونورشس Clonorchis تكون أحادية الجنس Monoecious حيث أن الدودة Fluke تنتج بيضاً مخصباً Fertilized ova وكل بيضة تحتوي على ميراسيديوم حي Viable Miracidium وهو عبارة عن مرحلة يرقية مبكرة. يترك البيض جسم الإنسان عن طريق البراز ويدخل المياه العذبة، حيث أن جنساً معيناً من القواقع Snails يكون أول عائل وسط First Intermediate host في دورة حياة Clonorchis عندما يبتلع القوقع يرقة الميراسيديوم الذي يفقس من البيضة في البيئة المائية. الميراسيديوم ينقسم عدة مرات لاجنسياً Asexually داخل القوقع ويتحول إلى عدد من السيركاريا Cercaria. هذه السير كاريا تكون حرة السباحة Free Swimming وتتحوصل encyst في أنسجة عضلات Muscle Tissue أسماك المياه العذبة وتصبح ميتاسيركاريا Metacercaria وهنا تبدأ الدودة دورة حياة جديدة.

جدول (11) ملخص لأنواع الشريطيات (المسطحات) الطفيلية:

Parasite	Disease	Clinical symptoms	Diagnostic Stage	Infective stage for humans
Clonorchis sinensis liver fluke	Chinese liver fluke infestaion	Blocking of bile ducts Jaundice ,cirrhosis	Ova in feces	Metacercaria in raw ,fresh water fish
Schistosoma mansoni Schistosoma haematobium Blood flukes	Schistosomiasis	Spleen and liver enlargement , cirrhosis, Schistosomal dysentery	Ova in feces	Free – swimming Cercaria in – fresh water penetrate skin and enter circulatory system
Taenia saginata beef tapeworm	Beef tapeworm infestation	Diarrhea , increased appetite, intestinal obstruction	Ova or proglottids in Feces	Cysticercus
Taenia solium pork tapeworm	Pork tapeworm infestation	Persistent diarrhea, serious complications with bladder worm encystment	Ova or proglottids . in feces , surgical detection of bladderwort	Cysticercus Or ova
Echinococcus granulosus	Hydatid disease or echinococcosis	Symptoms vary depending on location of cysts	Precipitin skin tests	Ova

الطريقة : Procedure

1. خذ شريحة محضرة للدودة الناضجة كلونورشس Adult Clonorchis وادرسها بعناية بواسطة Scanning lens أو Dissecting Microscope إذا وجد.

2. قارن هذه الشريحة بالرسمة في شكل (72). ليس من الضروري إيجاد جميع التركيبات Structures كما في الشكل ولكن من الأهمية في المستقبل التعرف على هذا الطفيل.

3. إعمل رسمة توضيحية واكتب البيانات عليها.

4. خذ شريحة محضرة لبيض الكلونورشس **Clonorchis** ova وادرسها تحت العدسة الكبرى High power objective. لاحظ الغطاء على شكل قبة Lid - like Dome في نهاية البيضة والعقدة الصغيرة Small Knob في النهاية الأخرى (شكل 72).

5. ميز الميراسيديوم Miracidium داخل البيضة إذا وجد.

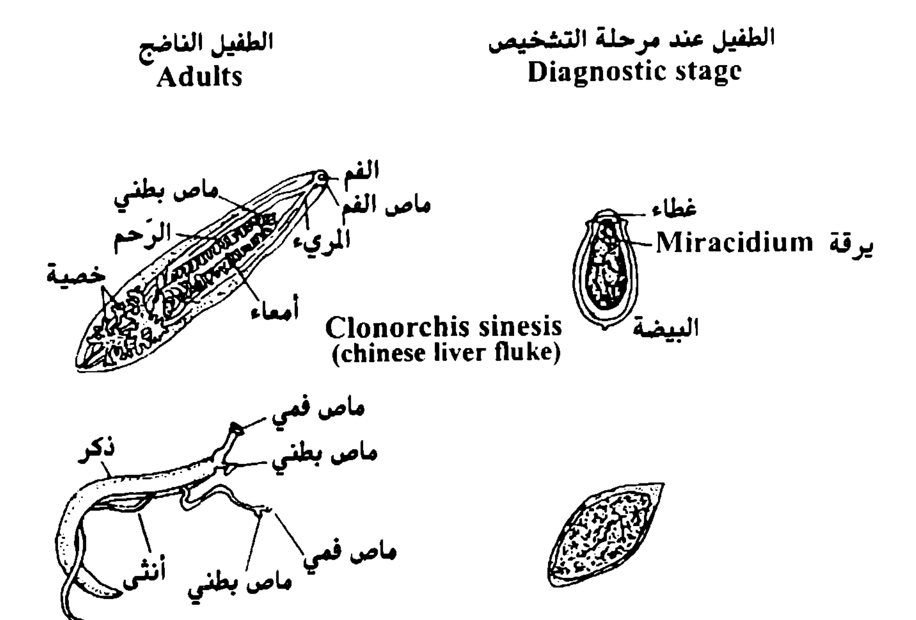
6. إرسم ما ترى واكتب البيانات ونبذة قصيرة عن المرض الذي تسببه كلونورشس **Clonorchis**.

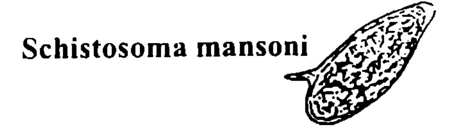
تمرين (81):

دراسة دودة البقر الشريطية The Beef Tapeworm (Taenia Saginata)

الإنسان يصاب بدودة البقر الشريطية عن طريق لحم بقر طازج أو غير مطهى جيداً ومصاب بهذه الدودة. يرقات هذه الدودة تسمى Cysticerci والموجودة في لحم البقر تدخل أمعاء الإنسان ثم يلتصق الرأس scolex بالطبقة المخاطية للأمعاء Intestinal Mucosa حيث تبدأ الدودة في النمو. عادة دودة واحدة فقط تتطور إلى الدور الناضج في الأمعاء بالرغم من أن عشرات اليرقات

قد تناولها الإنسان. البيض لهذه الدودة يخرج إلى الطبيعة عن طريق براز الإنسان حيث يدخل إلى البقرة عند التهامها للحشائش. تفقس اليرقات من البيض في أمعاء البقرة. تنفذ اليرقات بعد ذلك خلال جدار الأمعاء وتمر في الجسم من خلال الدم وأخيراً تتحوصل في العضلات المحززة Striated muscles على شكل Cysticerci. هذه الديدان Bladder worms تكون سهلة الرؤية بالعين المجردة ويمكن اكتشافها عن طريق مفتشي اللحوم في السلخانات Slaughter Houses. لحوم الحيوانات المصابة تسمى اللحوم المحصوبة Measly Beef بسبب ظهور أعداد كبيرة من Cysticerci في لحم البقر. اللحوم المصابة عادة تحذف منعاً للإصابة في الإنسان. بيض دودة البقر الشريطية Taenia saginata غير معدٍ للإنسان، أي أن البيض يجب أن يفقس داخل البقر ويتحول إلى Cysticerci التي تكون بدورها معدية للإنسان، لذلك يجب التخلص من فضلات الإنسان بطريقة أكثر صحية حتى نمنع انتشار الإصابة بدودة البقر الشريطية بواسطة تناول البقر لحشائش ملوثة ببيض الدودة أثناء الرعي.





شكل (72). الديدان المسطحة الطفيلية (المثقبات) Trematodes

الإصابة بدودة البقر الشريطية يرافقها إسهال Diarrhea وقيء Vomiting وألم في المعدة Epigastric pain، كذلك نقص في الوزن وزيادة في الشهية يمكن أن تظهرا عند الإصابة لمدة طويلة. العلاج الناجح يجب أن يكون في التخلص من رأس Scolex الدودة الشريطية حتى لا يحدث نمو جديد للدودة Regeneration كذلك يجب التأكد من عدم وجود Scolex في براز المريض بعد العلاج للتأكد من نجاح العلاج.

الطريقة : Procedure

1. خذ شريحة لقطاعات دودة البقر الشريطية وادرسها بعدسة Scanning

lens أو بالمجهر Dissecting Microscope إذا وجد. أعطِ انتباهاً خاصاً إلى الرأس Scolex والفلقات الحبلى Gravid Proglottids. إرجع إلى شكل (73).

2. إرسم ما ترى تحت المجهر واكتب البيانات على الرسم.

3. إرسم عينات محفوظة من دودة البقر الشريطية إذا وجدت، كما أحضر شريحة لبيضة دودة البقر الشريطية وافحصها تحت العدسة الكبرى.

4. إرسم البيض واكتب البيانات وكن قادراً على تشخيص هذا البيض في عينات البراز في المستقبل. تذكر دائماً بأن الإصابة بدودة البقر الشريطية تشخص في أغلب الأحيان عن طريق التعرف على البيض.

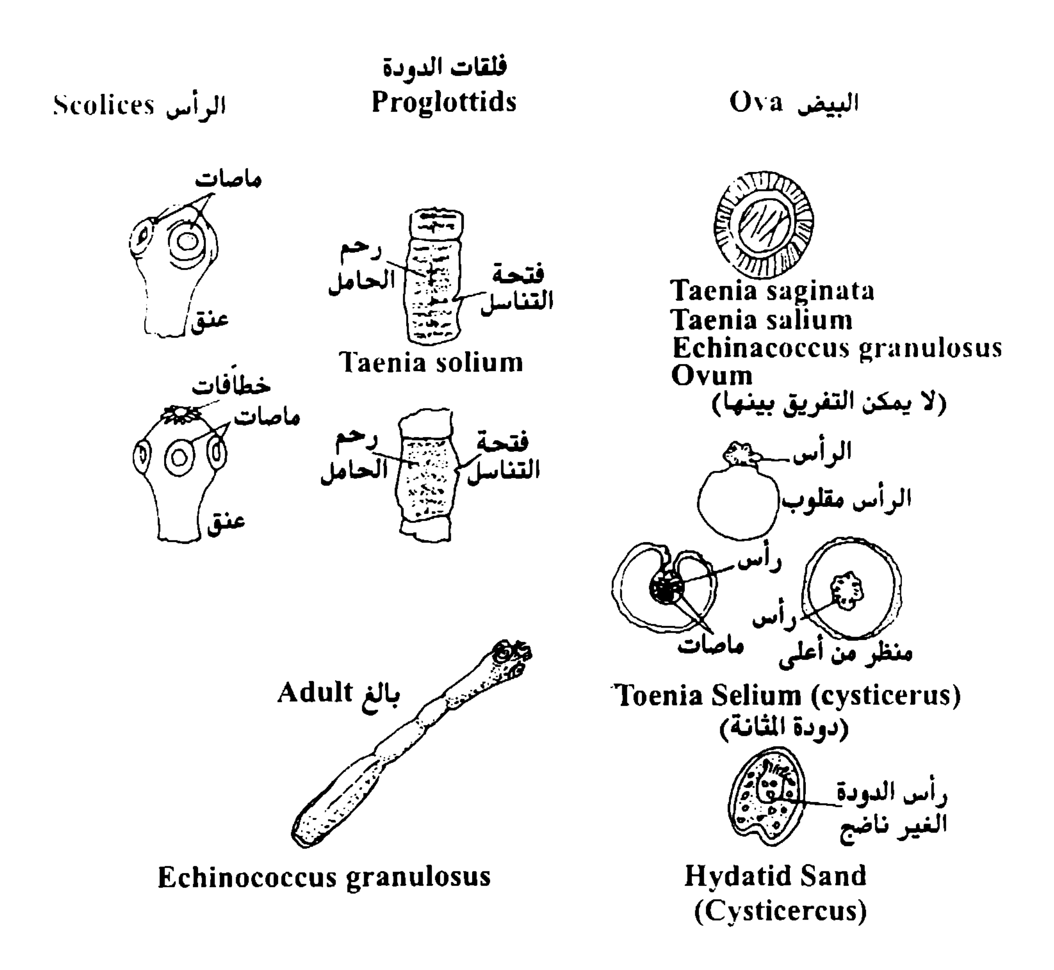
5. أكتب نبذة قصيرة عن المرض الذي تسببه دودة البقر الشريطية.

تمرين (82):

دراسة دودة الخنزير الشريطية The Pork Tapeworm **(Taenia solium)**

تعتبر دورة حياة دودة الخنزير الشريطية متطابقة مع دورة حياة دودة البقر الشريطية. عندما يبتلع الخنزير البيض فإن اليرقات تفقس من البيض في أمعاء الخنزير. اليرقات تتخلل الأنسجة حتى تصل إلى مجرى الدم Blood Stream حيث تدور Circulate في الدم وأخيراً تصل إلى أنسجة العضلات المحززة Striated Muscle Tissue حيث تتحوصل على شكل ديدان مثانة Bladderworm. عندما يبتلع الإنسان ingest هذه اليرقات cysticeri المتواجدة في لحم الخنزير غير المطهو Rare pork فإنها تتطور إلى ديدان ناضجة Adult worms في جسمه وتبدأ الإصابة infestation بهذه الدودة. الفرق الرئيسي بين دورة حياة دودة البقر الشريطية **Taenia saginata** ودودة الخنزير الشريطية **Taenia solium** هي أن بيض دودة الخنزير الشريطية يعتبر معدياً للإنسان Infectious for Humans ولكن بيض دودة البقر الشريطية غير معدية. ولأنه لا

يمكن التفريق بين بيض كلا النوعين لهذه الدودة لذا يجب أن يكون هناك اهتمام كبير بطريقة التخلص من براز الأشخاص المصابين بهذه الدودة.



شكل (73). الديدان الشريطية Cestodes.

هذا المرض في الإنسان Human cesticercosis ينتج من ابتلاع بيض دودة الخنزير الشريطية **Taenia solium**. عندما يفقس البيض، تدخل اليرقات إلى جدار الأمعاء ومنها إلى مجرى الدم حيث تتحوصل في أنسجة العضلات المحززة Striated Muscle Tissues تحت الجلد وبعض الأحيان في أعضاء الجسم الحيوية. العدوى Cesticercosis بهذه الدودة في الإنسان أو في الخنزير تشبه حالة اليرقانة المثانية Bladderworm في الأبقار Cattle وهو ما يعرف بلحم البقر المحصوب Measly Beef، لكن يرقات دودة الخنزير الشريطية تعتبر أصغر بكثير من يرقات دودة البقر الشريطية وأيضاً لا ترى بالعين المجردة. عندما يتعرض الإنسان لعدوى دودة الخنزير الشريطية Cysticercosis فإن دورة حياة دودة الخنزير الشريطية تتوقف في مرحلة اليرقانة المثانية، وهذا يعني أن الإنسان يصبح العائل الوسط Intermediate Host والعائل الأخير Final Host لهذه الدودة. أعراض المرض: يعتمد على مكان الأكياس، فهي ربما تحدث في العين Eye، في الدماغ Brain، في العضلات Muscles أو في الأحشاء Visceral organs وكثير ما تحدث الإصابة في الأنسجة تحت الجلد Subcutaneous Tissue

الطريقة: Procedure

1. أحضر شرائح محضرة Prepared Slide لقطاع من دودة الخنزير الشريطية **Taenia solium** وافحصها بواسطة عدسة الفحص الدقيق Scanning أو بواسطة المجهر المحلل Dissecting Microscope إذا توفر. أعطِ انتباهاً خاصاً إلى الرأس Scolex وكذلك إلى الأجزاء Gravid Proglottids. إرجع إلى الشكل (73).

2. إرسم ما ترى واكتب البيانات عن تركيبات الدودة التي تظهر لك واضحة.

3. إختبر عينات محفوظة من دودة الخنزير الشريطية وكذلك اليرقات Cysticerci إذا توفرت.

4. أحضر شريحة لليرقة Cysticercus وادرسها تحت المجهر بالقوة الصغرى ثم ارسم واكتب البيانات على الرسمة.

5. إفحص بالعدسة الكبرى (× 40) شريحة لبيض دودة الخنزير الشريطية وشريحة لبيض دودة البقر الشريطية. سوف تلاحظ بأنه لا يوجد فرق بينهما.

6. أكتب نبذة قصيرة عن المرض الذي تسببه دودة الخنزير الشريطية.

دراسة المشوكة الحبيبية - مرض الأكياس

Echinococcus granulosus - Hydatid Disease

الدودة الناضجة Adult worm لهذا النوع من الديدان تحدث في الكلاب، عادة بأعداد كبيرة وهي صغيرة الحجم وتتكون فقط من ثلاثة أجزاء Three Proglottids. الكلب عادة يصاب بهذه الدودة عن طريق أكله أحشاء أو أمعاء حيوان آخر مصاباً بيرقات الدودة Larvae of **Echinococcus granulosus** (شكل 73). براز الكلاب يحتوي على البيض الذي عند ابتلاعه يكون مصدر العدوى للإنسان. الأغنام والأبقار وبعض الأحيان الإنسان تعتبر العائل الوسط لمرحلة اليرقات. مرحلة اليرقات هذه تسمى كيس عداري Hydatid cyst. هذا الكيس يسبب مرض Hydatid disease والذي يعتبر من الأمراض الخطيرة. أعراض المرض تعتمد على حجم ومكان هذا الكيس.

حجم هذا الكيس يبلغ في أغلب الأحيان حجم كرة القدم ويكون مملوءاً بسائل. يمكن أن تتكون براعم Buds داخل الكيس حيث تنمو إلى أقراص حضانة Brood capsules وتتطور منها رؤوس غير الناضجة Immature Scolices ليس لها القدرة على النضوج. هذه الرؤوس الغير ناضجة تسمى هيداتيد الرمل Hydatid sand. إذن في **E. granulosus** التكاثر Multiplication يحدث في

الحالتين: في حالة الدودة الناضجة أو الكاملة وفي مراحل اليرقات. عندما يكبر الكيس يحدث ضغطاً على الأنسجة المجاورة ويضر بها. إذا انفجر الكيس فإن محتوياته تنتشر في الأنسجة المجاورة وتتكون أكياس جديدة في الإنسان. الكبد هي أكثر الأعضاء إصابة بهذه الأكياس وتأتي الرئة في الترتيب الثاني. الاستئصال الجراحي لهذه الأكياس التي تتواجد في أماكن قابلة للجراحة والتي لم تنتشر بعد إلى أماكن بعيدة في الأنسجة المحيطة هي الوسيلة الوحيدة للتخلص من المرض بهذه الدودة Hydatid Disease. يجب الحذر عند الجراحة لتجنب تسرب محتويات الأكياس إلى الأماكن المجاورة لمكان الجراحة.

تمرين (83):

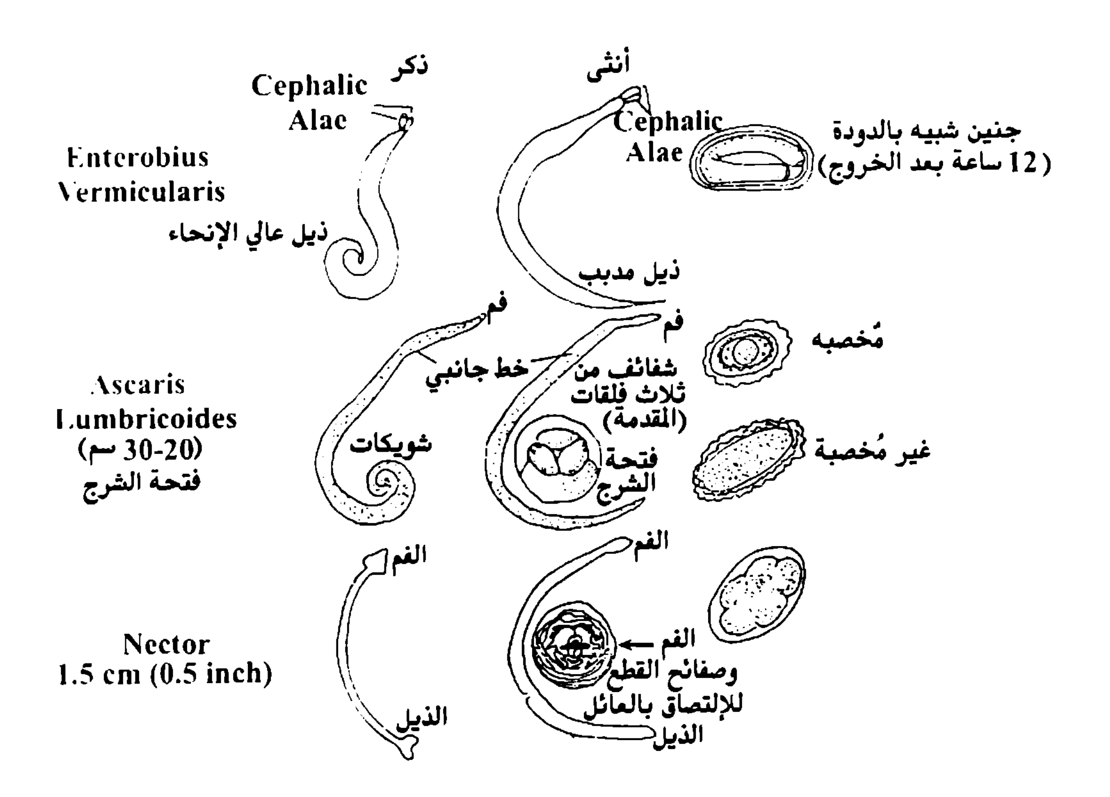
دراسة المشوكة الحبيبية في المعمل

الطريقة: Procedure

إفحص شرائح وعينات محفوظة لهذه الدودة **E. granulosus** والأكياس Hydatid cysts ثم ارسم واكتب البيانات على الرسم، كما أكتب نبذة قصيرة عن المرض Hydatid Disease.

بعض الإصابات بالديدان السلكية (الخيطية) في الإنسان
Some Nematode infestations of Humans

الديدان الطفيلية المدورة التي تصيب الإنسان كلها تتبع مرتبة الديدان السلكية (الخيطية) في شعبة أسكهلمنث Phylum Aschelminthes. هذه الحيوانات شكلها أسطواني، جسمها غير مقسم Unsegmented ومدببة في كلا الطرفين (شكل 74). جسم الدودة مغطى بطبقة أهاب متينة Tough layer of cuticle والتي تحمي الطفيل من عصارة المعدة Gastric juice وأنزيمات الهضم Enzymes of Digestion في الجهاز المعوي للعائل.



شكل (74). بعض الديدان السلكية (الخيطية) المتطفلة Some parasitic Nematodes

الديدان السلكية تكون منفصلة الجنس Dioecious حيث الذكر يكون عادة أصغر وأرفع من الأنثى. ذكور أغلب الأنواع تكون ذات ميول حادة Sharply curved في النهاية الخلفية للجسم. الإناث تنتج كميات كبيرة من البيض يومياً وهذه الصفة تعتبر ذات أهمية حيث تساعد المتخصصين في

المعامل الطبية في تشخيص الإصابات بهذه الطفيليات. بيض الأجناس المختلفة التي تتطفل على الإنسان تختلف كثيراً عن بعضها مما له من أهمية كبيرة في التشخيص. أدرس جدول (12) والأشكال (74، 75) حول الديدان السلكية. في الحقيقة كل الإصابات التي تطرقت إليها في هذا التمرين كانت قد شخصت في المعامل الطبية Clinical Laboratories من بيض وجد في عينات براز المرضى Stool أو حول فتحة الشرج Perianal Region باستثناء الإصابات بمرض Trichinosis التي تسببها الدودة **Trichinella spiralis**. هذه الدودة تعتبر طفيلاً يصيب عادة الأنسجة وليس الأمعاء وتشخص عادة عن طريق الدراسة المجهرية لأنسجة حية للعضلات Muscle Biopsy وكذلك التحاليل المصلية Serologic Tests.

يوجد كثير من الديدان السلكية ولكن سوف أتطرق في هذه الدراسة إلى خمسة أنواع فقط.

المواد: Materials

- شرائح مجهرية جاهزة للأنواع الآتية:

Enterobius vermicularis (Adults)

Enterobius vermicularis (ova)

Ascaris lumbricoides (ova)

Necator americanus (adults)

Necator americanus (ova)

Trichuris trichiura (adults)

Trichuris trichiura (ova)

Trichinella spiralis (adults)

(متحوصلة في **Trichinella spiralis** encysted in skeletal muscle العضلات).

ـ عينات محفوظة للأنواع الآتية:

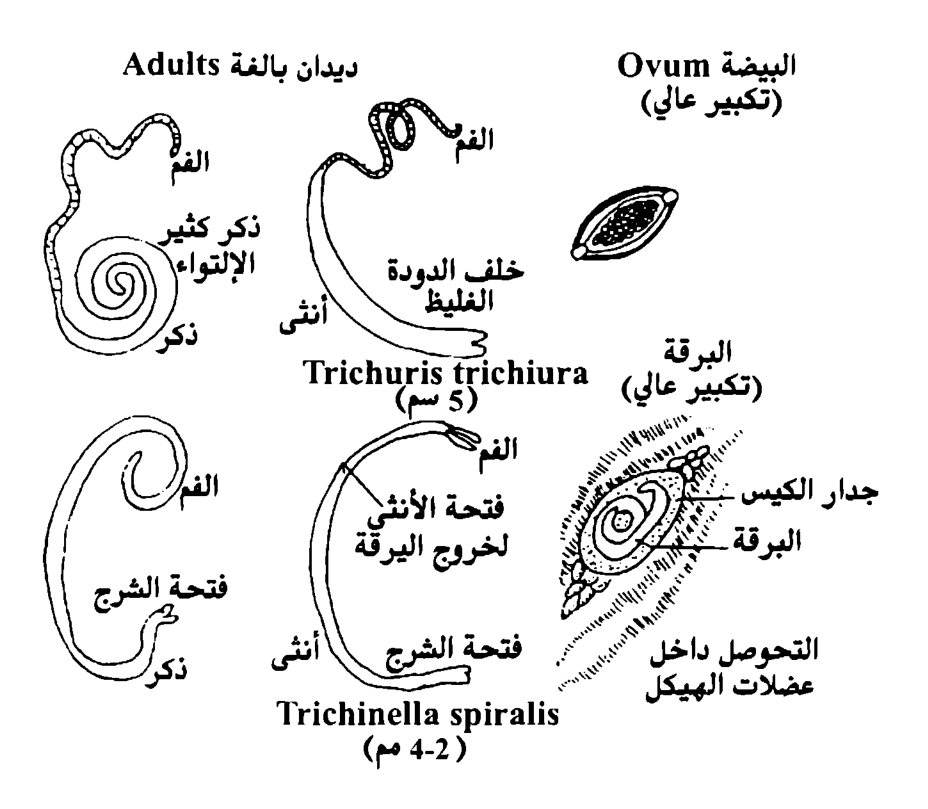
Ascaris lumbricoides (adults)

Necator americanus (adults)

Trichuris (adults)

(1) الدودة الدبوسية
Enterobius Vermicularis (Pinworm, Seatworm)

الإصابة بالدودة الدبوسية تحدث في الأشخاص على جميع المستويات الاقتصادية وتنتشر في العائلات والأماكن حيث عدم الاهتمام بالنظافة الشخصية. الديدان الكاملة Adult worms تسكن المصران الأعور Cecum للعائل ومنها تهاجر الأنثى الحامل إلى فتحة الشرج لتضع أعداداً كبيرة من البيض، حيث تحمل كل بيضة بداخلها جنيناً حياً وتبقى في الطبقات الخارجية لفتحة الشرج Perianal Folds. هذا البيض معدٍ في الحال وعند ابتلاعه من العائل تعديه من جديد أو تعدي عائلاً آخر. الإصابة بالديدان الدبوسية Pinworm infestations تحدث كثيراً في الأطفال بسبب عدم الاهتمام بتنظيف الأيدي ولأن الأطفال الصغار عندهم عادة الحك في أي وقت وفي أي مكان في الجسم به إثارة.



شكل (75). بعض الديدان السلكية (الخيطية) المتطفلة. Some Parasitic Nematodes

جدول (12) بعض الديدان السلكية (الخيطية) المتطفلة.

Parasites	Disease	Clinical symptoms	Diagnostic stage	Source of infection
Enterobius vermicularis	Pinworm infestation	Pruritis ani , diarrhea ,or asymptomatc	Ova from perianal region by Graham Scotch tape method	Ingestion of ova on hands and fomites or linens
Ascaris lumbricoides	Ascariasis	Allergic symptoms, abdominal pain or discomfort, intestinal blockage vomiting , diarrhea, pueumonitis , fever	Ova in feces	Ingestion of embryonated ova in soil , often in contaminated water or food
Necator americanus	Hookworm disease	Pulmonary or intestinal pain , anemia or asymptomatic	Ova in feces rarel y – larvae in feces	Larvae in soil burrow into skin of bare feet
Trichuris trichiura	Trichuriasis or whipwrm disease	Allergic symptoms or asymptomatic	Ova in feces	Same as Ascaris
Trichinella spiralis	Trichinosis	Mild gastrointestinal symptoms,painful respiration , heart muscle damage, muscle pain	Early infection – adults in feces, later – muscle biopsy and serologic tests	Ingestion of lavae in raw or under- cooked pork or bear meat

طرق عزل ودراسة الدودة الدبوسية:

طريقة شريط جراهام The Graham Scotch Tape Method

عادة تستعمل في عزل الدودة من عينات من المنطقة حول فتحة الشرج Perianal Region للتشخيص المعملي نظراً لأن البيض والديدان الكاملة غالباً لا ترى في عينات البراز. هذه الطريقة (تتبع الخطوات في شكل 76) غير مكلفة وهذه التقنية لجمع العينات بسيطة بحيث تستطيع الأمهات أخذ العينات بدون صعوبة. تنصح الأمهات بأخذ العينات لأطفالها لمدة ثلاثة أيام متتالية في الصباح بعد القيام من النوم، أي قبل استعمال الحمام أو الاستحمام.

تمرين (84):

طريقة الدراسة المعملية للدودة الدبوسية Enterobius Vermicularis

1. أحضر شريحة مجهرية جاهزة للدودة الكاملة **Enterobius Vermicularis** adult وادرسها تحت عدسة البحث الدقيق Scanning lens أو تحت المجهر المحلل Dissecting Microscope. أنظر شكل (74) للمقارنة وارسم ما ترى على الشريحة، كما أكتب البيانات على الرسمة موضحاً التركيبات المختلفة للطفيل.

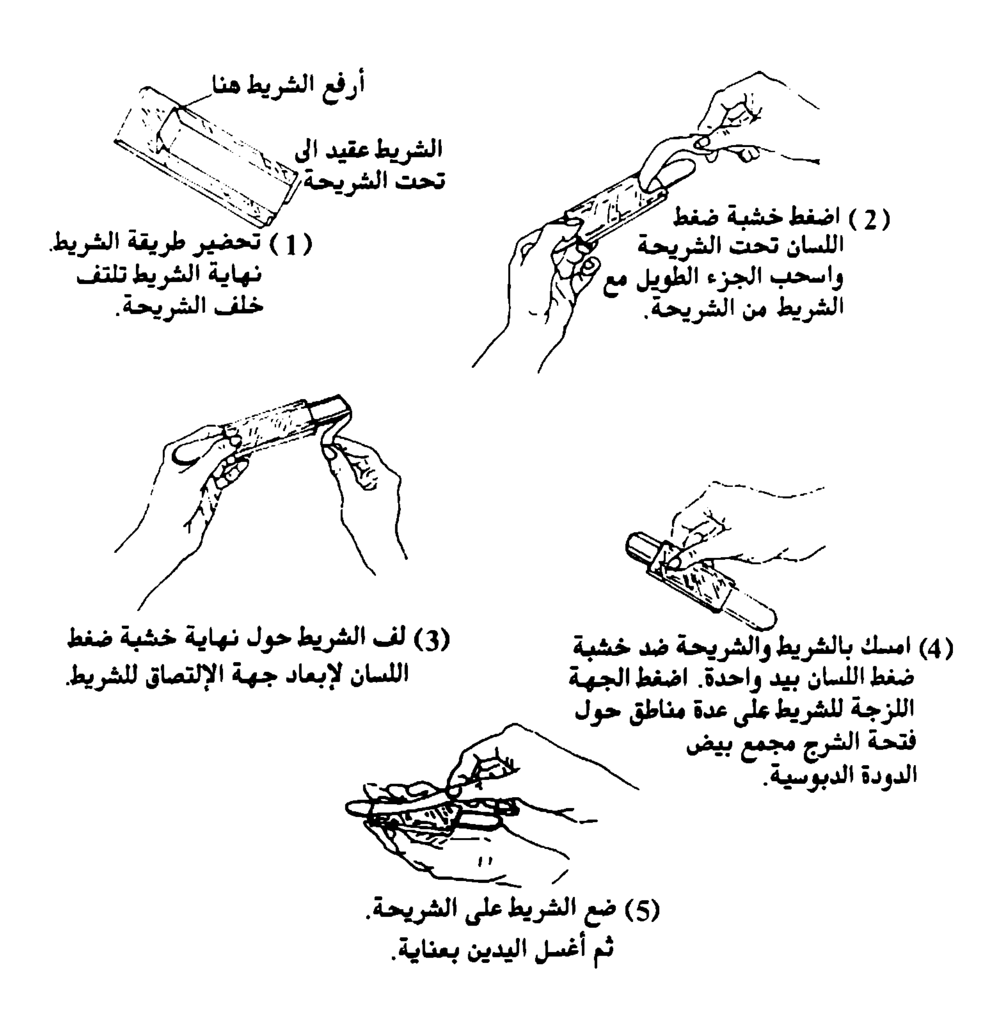
2. إفحص شريحة لبيض الدودة **Enterobius Vermicularis** ova بالعدسة الكبرى (× 40) ثم ارسم ما ترى واكتب البيانات مستعيناً بشكل (74). ونظراً لأن البيض هو الطريقة الرئيسية لتشخيص الدودة، لذا يجب فحص هذه الشريحة بدقة ومعرفة المعلومات بدقة.

3. أكتب وصفاً عاماً للمرض الذي تسببه الدودة الدبوسية.

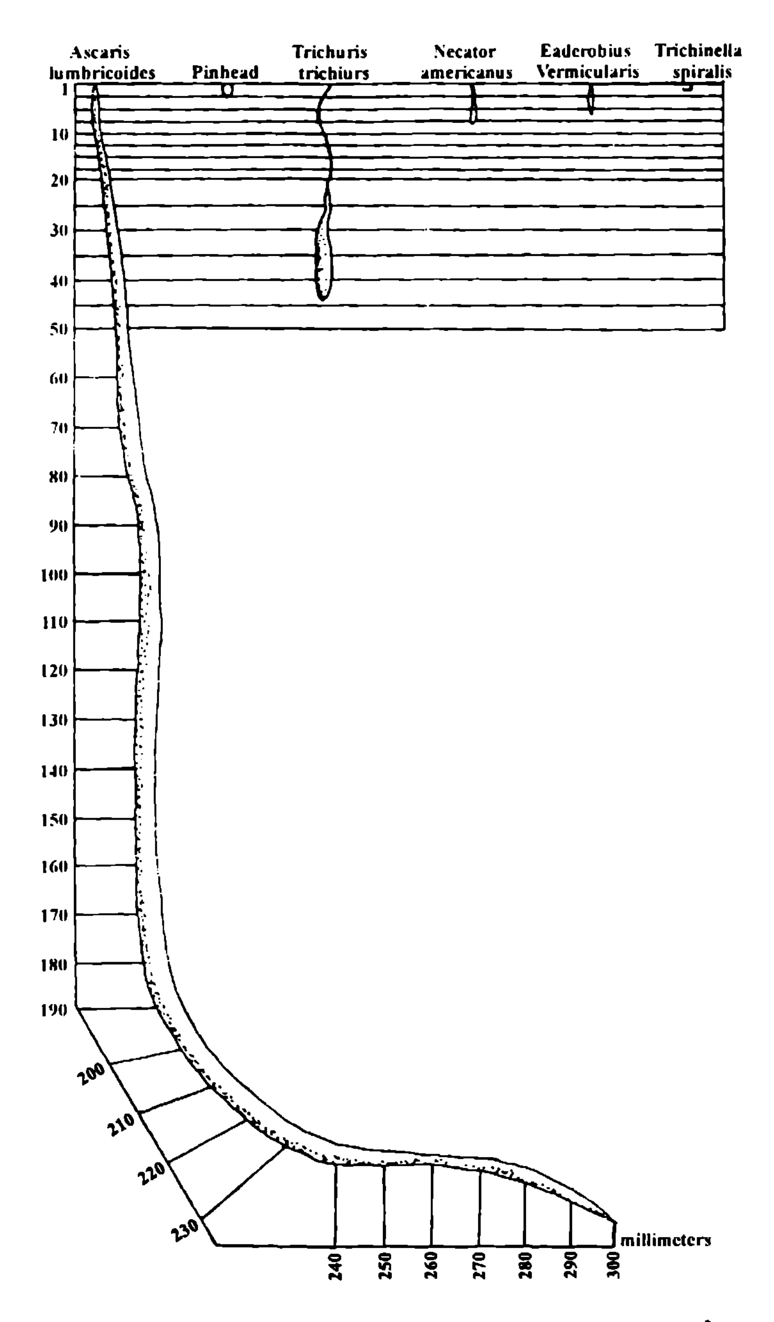
(2) دودة الأسكارس
Ascaris Lumbricoides

عبارة عن طفيل معوي Intestinal parasite ولكن في الواقع لا يتطفل على أنسجة الأمعاء ولكن يسكن الجهاز المعوي للعائل ويمتص المواد الغذائية المهضومة أولياً. دودة الأسكارس تعتبر أكبر الديدان السلكية في الإنسان Largest intestinal nematode of Humans. الديدان الكاملة النمو تبلغ حوالي 20 إلى 30 سم أو أكثر في الطول. أنظر شكل (77). الديدان كاملة النمو Adults تعيش في تجويف Lumen الأمعاء الدقيقة غير ملتصقة بالعائل. أغلب ديدان الأسكارس Ascarids التي تعزل من الخنزير يكون حجمها أكبر من تلك التي تصيب الإنسان.

بيض الاسكاريوس يكون معدياً للإنسان فقط بعد مضي أسبوعين أو أكثر من النضج في التربة. بمجرد أن يبتلع الإنسان البيض المحتوي على الأجنة فإن اليرقات Larvae تفقس من البيض في الإثني عشر حيث تتخلل الأمعاء الدقيقة وتدخل إلى الدورة الدموية Portal circulation التي بدورها تحملها من الجهة اليمنى من القلب إلى الرئتين. يرقات الأسكارس ربما تبقى في الرئتين لعدة أيام قبل أن تتخلل الشعيرات الهوائية Pulmonary capillaries لتصل إلى السنخات Alveoli لتفسح لنفسها الطريق لتصعد خلال القصبة الهوائية Trachea حيث بواسطة السعال تدخل الزدمة أو المزمار The Glottis ويبتلعها الإنسان لتهبط من المريء Eosophagus إلى الأمعاء الدقيقة حيث تتطور إلى ديدان ناضجة مذكرة ومؤنثة Adult Males and Females.



شكل (76). طريقة شريط Graham لجمع عينات الدودة الدبوسية Pinworm



شكل (77). بعض أنثى الديدان السلكية Nematodes البالغة النمو والنامية داخل الأمعاء. لاحظ العلاقة بين الأحجام. (Beishir, 1983)

اليرقات في الرئتين غالباً ما تسبب التهاباً رئوياً Pneumonitis وفي بعض الأحيان تتبعها إصابة بكتيرية، حرارة عالية Fever، نوبات سعال Coughing spasms، ضيق في التنفس Asthmatic Breathing تعتبر أعراضاً مميزة لمرحلة تواجد الأسكارس في الرئتين. فرط الحساسية Hypersensitivity لدودة الأسكارس يظهر على شكل تفاعلات حساسية Allergic Reactions مثل الطفح الجلدي Rashes. منع الإصابة بدودة الأسكارس وما تسببه من أمراض خطيرة يعتمد على تجنب تلوث التربة ببراز بشري معد. لنذكر من جديد بأن العناية بالصحة العامة واتباع طرق صحيحة في التخلص من البراز البشري تعتبر مهمة جداً لمنع الإصابة بدودة الأسكارس.

تمرين (85):

دراسة دودة الأسكارس في المعمل Ascaris Lumbricoides

1. إفحص وارسم دودة كاملة للأسكارس Adult **Ascaris**
2. أحضر شريحة جاهزة لبيض الأسكارس وادرسها بواسطة العدسة الكبرى (× 40). أرسم واكتب البيانات بدقة وذلك لأهمية البيض في تشخيص الإصابة بهذه الدودة.
3. أكتب نبذة عن الإصابة بمرض الأسكارس **Ascaris**.

(3) الدودة الخطافية
Necator americanus (The Hookworm)

تلتصق بتبطين الأمعاء الدقيقة intestinal Lining للعائل عن طريق صفائح قاطعة Cutting plates وتتغذى على الدم Blood والسائل الليمفاوي lymph والأغشية المخاطية Mucous Membranes. هذه الدودة تمتص غذاءها

عن طريق ضخ البلعوم Pumping pharynx الذي يعتبر مجهزاً بعصارة Secretion مانعة لتجلط دم العائل. الإصابة بالدودة الخطافية تسبب عادة فقر الدم Anemia للعائل.

المرض الناتج عن الدودة الخطافية Hookworm Disease ينتشر في المناطق الريفية Rural Areas حيث النقص في صيانة الصحة العامة Sanitation وحفاء القدمين barefooted عند كثير من الناس. الدودة الناضجة تبلغ حوالي 1 إلى 1.5 سم في الطول.

البيض المخصب يخرج مع براز الشخص المصاب وفي الظروف الملائمة وهي التربة الدافئة الرطبة والمظللة فإن البيض يفقس خلال 24 إلى 48 ساعة. اليرقات تتغذى على البراز أو بقايا عضوية في التربة وتصبح معدية للإنسان بعد عدة تطورات. اليرقات المعدية عادة تدخل الجسم عن طريق الحفر خلال الجلد الناعم على جانبي الرجل وبين أصابع الأرجل مسببة حكة في قاع القدم «Ground itch» of the feet، وبمجرد ما تصبح اليرقات داخل الجسم فإنها تدخل مجرى الدم والأوعية الليمفاوية وتمر خلال القلب ومنه إلى الرئتين ومنها إلى الشعيرات الرئوية ثم إلى السنخ Alveoli حيث تصعد خلال شجرة الشعيبات الرئوية Bronchial Tree وبعدها إلى القصبة الهوائية Trachea ومنها إلى المزمار glottis ثم تهبط خلال المريء Eosophagus ومنه إلى الأمعاء الدقيقة. بعد دخول اليرقات للأمعاء تتطور وتنضج إلى إناث وذكور حيث تتزاوج وتنتج بيضاً مخصباً Fertile Ova (عدة آلاف يومياً).

كما ذكرت سالفاً بأن الديدان الناضجة أو المتكاملة تلتصق بالأغشية المخاطية بواسطة الصفائح القاطعة Cutting Plates وتتغذى على الدم والسائل والليمفاوي للعائل. عندما الديدان تضخ دماً أكثر من الكمية التي تهضمها فإن الجروح التي تسببها في الأمعاء سوف تنزف بشدة بسبب الإفراز المضاد للتجلط Anticoagulant التي تُنتجه الدودة في الأمعاء. هذه الحالة تسبب فقر دم Anemia للعائل.

الأطفال المصابين بعدد كبير من الديدان الناضجة (100 أو أكثر) يكونون معاقين عقلياً وجسدياً Retarded Mentally and Physically . أي شخص مصاب بعدد كبير من الدودة الخطافية يصبح عنده فقر دم، كثير النعاس والنوم، كسول Lethargic وأكثر حساسية للأمراض الأخرى. بالعلاج الكيميائي Chemotherapy يمكن القضاء على الدودة الخطافية داخل الجسم، كذلك صيانة الصحة العامة Sanitation وطريقة صحيحة للتخلص من البراز البشري بالإضافة إلى ارتداء الحذاء باستمرار كلها كفيلة بمنع الإصابة بهذه الدودة.

تمرين (86):

دراسة الدودة الخطافية في المعمل Necator americanus

1. أحضر شريحة جاهزة للدودة الخطافية الكاملة النمو وادرسها بواسطة العدسة الصغرى (× 10). إرسم واكتب البيانات على الرسمة.
2. كذلك أدرس عينات محفوظة للدودة الكاملة النمو.
3. إفحص شريحة لبيض هذه الدودة بالعدسة الكبرى (× 40) وارسم بيضة واكتب البيانات بدقة لأهميتها في التشخيص.
4. أكتب نبذة قصيرة عن المرض الذي تسببه الدودة الخطافية **Necator americanus**.

(4) الدودة السوطية
Trichuris trichiura (the whipworm)

تسمى هكذا لأنها تأخذ عادة شكل السوط Whip حيث أن المقدمة Anterior طويلة ورقيقة والمؤخرة Posterior غليظة ومدورة مثل يد السوط (شكل 75). الديدان السوطية الناضجة تلتصق بتبطين الأمعاء الغليظة Lining

Pinworm هذه الدودة طولها يبلغ حوالي ضعف الدودة الدبوسية of Cecum. أي حوالي 5 سم. الديدان الناضجة تعيش جزئياً مطمورة في الطبقة المخاطية Mucosa للأمعاء الغليظة Large intestine. كل أنثى تنتج حوالي 5.000 بيضة مخصبة يومياً التي تخرج من الشخص المصاب عن طريق البراز.

بيض الدودة السوطية يكون غير ناضج عند خروجه مع البراز ويحتاج من 10 إلى 14 يوم لكي ينضج في التربة ويصبح معدياً infective. البيض الناضج الذي يحتوي على أجنة يجب أن يبتلع لكي يسبب الإصابة بالمرض بهذه الدودة. الطبقة الخارجية Outer Layer للبيضة تهضم وتخرج اليرقات حيث تتطور إلى ديدان ناضجة في الأمعاء الدقيقة، بعدها إلى الأمعاء الغليظة Large intestine حيث تلتصق بالطبقة المخاطية.

في الإصابات الخفيفة بالدودة السوطية Light whipworm Infestations عادة لا تظهر أعراض Asymptomatic. الإصابات الكبيرة عند الأطفال ينتج عنها التهاب في الطبقة المخاطية للأمعاء الغليظة ويظهر هذا على شكل إسهال مخاطي أو دموي، مصحوب بتسمم Systemic Toxicity، تفاعلات حساسية Allergic Reactions وفقر دم. هذه الأعراض شبيهة بأعراض الإصابة بالدودة الخطافية.

كذلك هنا المرض بالدودة السوطية Trichuriasis ينتشر في المناطق الريفية حيث النقص في صيانة الصحة العامة. التخلص من البراز البشري بطرق جيدة وعدم تلوث التربة بهذا البراز كفيل بتجنب الإصابة بالدودة السوطية.

تمرين (87):

دراسة الدودة السوطية في المعمل <u>Trichuris trichiura</u>

1. أحضر شريحة جاهزة لدودة سوطية كاملة وادرسها تحت Scanning lens أو Dissecting Microscope ثم ارسم الذكر والأنثى.

2. إختر شريحة جاهزة لبيض الدودة السوطية وادرسها بالعدسة (× 40)، ثم ارسم بيضة واكتب البيانات بدقة على الرسم نظراً لأهمية البيض في تشخيص الإصابة بهذه الدودة.

3. أكتب نبذة عن الإصابة بالدودة السوطية.

(5) الدودة اللولبية
Trichinella spiralis

هذه الدودة تتطفل على الأنسجة Tissues وهذا عكس بقية الطفيليات السلكية أو الخيطية Nematodes. الأنثى Female Trichina Worm تختلف عن بقية الديدان المدورة في كونها تخرج يرقات حية وكاملة التطور بدل من البيض. هذه الدودة اللولبية تهاجر من الأمعاء بواسطة الحفر خلال الطبقة المخاطية Mucosa للزغب Villi المعوية وتخزن يرقاتها في العقد الليمفاوية Lymph Nodes. اليرقات الناضجة تصل إلى الدورة الدموية وتنتشر في الجسم حتى تصل إلى أنسجة العضلات المحززة Striated Muscle حيث تتحوصل Encyst. الأكياس Cysts تصبح ببطء متكلسة Calcified ولكن اليرقات تبقى حية لعدة أشهر بالرغم من أنها لا تستطيع أن تتطور إلى ديدان ناضجة إلاّ بعد ابتلاعها من عائل آخر.

حجم الدودة اللولبية حوالي نصف حجم الدودة الخطافية أو 2 ـ 4 مم في الطول، ولذا تصعب رؤيتها (ولكن ترى بالعين المجردة في عينات البراز). خلال الأسابيع الأولى من العدوى Infestation، بالإمكان رؤية الديدان الناضجة بواسطة المجهر في عينات براز المرضى الذين يشكون من الإسهال الذي تسببه هذه الدودة. العدوى تأتى من أكل اللحوم غير المطهوة جيداً وخاصة لحم الخنزير Pork أو في بعض الأحيان لحم الدب Bear.

حدة أعراض المرض Trichinosis Symptoms تعتمد على عدد اليرقات الحية المبتلعة ويمكن تلخيص الأعراض في الآتي: إضطراب في الجهاز المعوي Gastrointestinal Discomfort، ألم عضلي Muscle pain، قشعريرة Chill، ضعف عام Weakness وبعض الأحيان إجهاد جسدي Prostration، ضيق في التنفس Respiratory Distress مع ألم في عضلات القلب عندما تتحوصل اليرقات في الحجاب الحاجز Diaphragm أو عضلات القلب الذي ربما ينتج عنه الوفاة. تظهر الأجسام المضادة Antibodies في جسم الإنسان بعد أسبوعين أو ثلاثة من بداية الإصابة. هذه الأجسام المضادة هي الأساس في التشخيص المصلي Serologic Diagnosis لهذا المرض Trichinosis.

تمرين (88):

دراسة الدودة اللولبية في المعمل Trichinella spiralis

1. أحضر شريحة جاهزة للدودة كاملة النمو Adult وادرسها بالعدسة الصغرى (× 10) واكتب البيانات على الرسمة (ذكر أو أنثى إذا أمكن).
2. إفحص شريحة جاهزة ليرقات الدودة متحوصلة في أنسجة العضلات المحززة Striated Muscle Tissues تحت العدسة الكبرى (× 10) ثم ارسم واكتب البيانات.
3. أكتب نبذة عن المرض Trichinosis.

أسئلة:

1. ماذا تشمل الكائنات الحية التي تعرف بالفطريات؟
2. كيف تتكاثر الخمائر Yeasts؟
3. لماذا استعمل عصير العنب في دراسة الفروق الفيزيولوجية بين الخمائر؟
4. لماذا لا نحتاج إلى صبغ الفطريات عند دراستها؟

5. ما المقصود بمزارع الشرائح Slide Culture؟

6. ما هي المكونات للوسط Sabouraud Dextrose Agar؟

7. ما هي فوائد تقنية المزرعة المصغرة Microculture عند دراسة خواص الفطريات؟

8. ما المقصود بالحيوانات الأولية؟

9. ما أهمية التروفوزيت Trophozoite والأكياس Cysts طبياً لطفيل **E. histolytica**؟

10. لماذا تعتبر يوجيلينا مرحلة انتقال بين الحيوان والنبات؟

11. لماذا يوجد أنواع من البروتوزوا Protozoa حرة المعيشة؟

12. تكلم عن دورة حياة طفيل الملاريا Plasmadium.

13. كيف يتم الكشف على الديدان الشريطية في المريض؟ أذكر بعضاً منها.

14. تحدث عن دورة حياة الكبد الصينية. ما إسم اليرقة المبكرة لهذه الدودة؟ وما هو إسم أول عائل تدخل فيه؟

15. لماذا استعمل Scanning Lens أو Dissecting Microscope في دراسة هذه الدودة؟

16. كيف يصاب الإنسان بدودة البقر الشريطية؟

17. تحدث عن دورة حياة دودة البقر الشريطية.

18. ما المقصود باللحوم المحصوبة Measly Beef؟

19. كيف يتعرف على إصابة الإنسان بدودة البقر الشريطية؟ كيف يتم العلاج الناجح؟

20. ما هي الفروق بين دودة البقر الشريطية ودودة الخنزير الشريطية؟

21. أين تحدث الإصابة بدودة الخنزير الشريطية في جسم الإنسان؟
22. كيف تنتقل المشوكة الحبيبية إلى الإنسان؟
23. ما المقصود بكيس عداري Hydatid Cyst؟
24. صف تركيب الديدان السلكية (الخيطية).
25. كيف يتم تشخيص الدودة السلكية في المريض؟
26. إشرح طريقة شريط جراهام لتشخيص الدودة الدبوسية.
27. اشرح الطرق التي تسلكها دودة الأسكارس حتى تسكن الأمعاء الدقيقة في الإنسان.
28. ما هي الأعراض التي يتسبب عنها وجود يرقات الأسكارس في الرئتين؟
29. لماذا تسبب الدودة الخطافية فقر الدم في الإنسان؟
30. كيف تتم الإصابة بالدودة الخطافية في الإنسان؟
31. ما هي أعراض الإصابة بالدودة السوطية؟
32. ما هي دورة حياة الدودة اللولبية؟
33. كيف يتم تشخيص مرض الدودة اللولبية؟

ملحق 1

الأوساط المزرعية المغذية Culture Media

1. الحساء المغذي Nutrient Broth

مستخلص اللحم	3.0 جرام	Meat Extract
بيتون	5.0 جرام	Peptone
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

2. الأجار المغذي Nutrient Agar

مستخلص اللحم	3.0 جرام	Meat Extract
بيتون	5.0 جرام	Peptone
أجار	15.0 جرام	Agar
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

3. حساء اللاكتوز Lactose Broth

مستخلص اللحم	3.0 جرام	Meat Extract
بيتون	5.0 جرام	Peptone
لاكتوز	5.0 جرام	Lactose
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

4. الجيلاتين المغذي Nutrient Gelatin

مستخلص اللحم	3.0 جرام	Meat Extract
ببتون	5.0 جرام	Peptone
جيلاتين	120.0 جرام	Gelatin
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

5. أجار إندو Endo Agar

ببتون	10.0 جرام	Peptone
لاكتوز	10.0 جرام	Lactose
فوسفات ثنائي البوتاسيوم	3.5 جرام	Dipotassium phosphate
أجار	15.0 جرام	Agar
سلفيت الصوديوم	2.5 جرام	Sodium sulfite
فوكسين قلوي	0.4 جرام	Basic Fuchsin
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

6. أجار الأيوسين - أزرق المثلين Levin's E.M.B. Agar

ببتون	10.0 جرام	Peptone
لاكتوز	10.0 جرام	Lactose
فوسفات ثنائي البوتاسيوم	2.0 جرام	Dipotassium phosphate
أجار	15.0 جرام	Agar
إيوسين Y	0.4 جرام	Eosin y
أزرق الميثلين	0.065 جرام	Methylene Blue
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

7. وسط أحمر المثيل ـ فوكس بروسكاور M.R - V.P. Medium

ببتون	7.0 جرام	Peptone
دكستروز	5.0 جرام	Dextrose
فوسفات ثنائي البوتاسيوم	5.0 جرام	Dipotassium phosphate
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

هذا الوسط المغذي يستعمل لإجراء اختبار Methyl Red واختبار Voges - Proskauer للتفريق بين البكتيريا في مجموعة coli - aerogenes.

8. حساء اللاكتوز أخضر البريلانت Brilliant Green Bile Lactose Broth

ببتون	10.0 جرام	Peptone
لاكتوز	10.0 جرام	Lactose
أملاح الصفراء	20 جرام	Oxhall
أخضر البريلانت	0.0133 جرام	Brilliant Green
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

9. وسط أيجكمان Eijkman Lactose Medium

تربتوز	15.0 جرام	Tryptose
لاكتوز	3.0 جرام	Lactose
فوسفات ثنائي البوتاسيوم	4.0 جرام	Dipotassium phosphate
فوسفات أحادي البوتاسيوم	1.5 جرام	Monopotassium Phosphate
كلوريد الصوديوم	5.0 جرام	Sodium Choride
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

10. أجار الأحمر بنفسجي Violet Red Bile Agar

مستخلص الخميرة	3.0 جرام	Yeast Extract
ببتون	7.0 جرام	Peptone
أملاح الصفراء رقم «3»	1.5 جرام	Bile Salts No. 3
لاكتوز	10.0 جرام	Lactose
كلوريد الصوديوم	5.0 جرام	Sodium Chloride
أجار	15.0 جرام	Agar
أحمر المتعادل	0.03 جرام	Neutral Red
صبغة الكريستال فايلت	0.002 جرام	Crystal Violet
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

11. أجار سابورويد دكستروز Sabouraud Dextrose Agar

نيوببتون	10.0 جرام	Neopeptone
دكستروز	40.0 جرام	Dextrose
أجار	15.0 جرام	Agar
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

12. أجار السترات Simmon's Citrate Agar

كبريتات المغنيسيوم	0.2 جرام	Magnesium Sulfate
فوسفات الأمونيا ثنائي الهيدروجين	1.0 جرام	Ammonium Dihydrogen phosphate
فوسفات ثنائي البوتاسيوم	1.0 جرام	Dipotassium Phosphate
سترات الصوديوم	2.0 جرام	Sodium Citrate
كلوريد الصوديوم	5.0 جرام	Sodium Chloride
أجار	15.0 جرام	Agar
أزرق الثايمول	0.08 جرام	Brom Thymol Blue
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

13. أجار عد المستعمرات* Plate Count Agar

تربتون	5.0 جرام	Tryptone
مستخلص الخميرة	2.5 جرام	Yeast Extract
دكستروز	1.0 جرام	Dextrose
أجار	15.0 جرام	Agar
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

* هذا الوسط يعرف أيضاً باسم Standard Methods Agar وكذلك باسم Tryptone Glucose yeast Extract Agar

14. أجار الأبواغ Sporulating Agar

مستخلص اللحم	1.5 جرام	Meat Extract
مستخلص الخميرة	3.0 جرام	Yeast Extract
كازيتون	4.0 جرام	Casitone
بيتون	6.0 جرام	Peptone
دكستروز	1.0 جرام	Dextrose
أجار	15.0 جرام	Agar
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

15. حساء التربتون Tryptone Broth

تربتون	10.0 جرام	Tryptone
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

16. وسط E C Medium: E. coli

تربتون	20 جرام	Tryptone
لاكتوز	5 جرام	Lactose
أملاح الصفراء رقم «3»	1.5 جرام	Bile Salts No. 3
فوسفات ثنائي البوتاسيوم	4 جرام	Dipotassium Phosphate

فوسفات أحادي البوتاسيوم	1.5 جرام	Monopotassium Phosphate
كلوريد الصوديوم	5 جرام	Sodium Chloride
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

17. مصل الدم Loeffler Blood Serum

مصل دم البقر	3 أجزاء	Beef Blood Serum
حساء الدكستروز	جزء واحد	Dextrose

18. أجار السكر الثلاثي والحديد Triple Sugar iron (TSI) Agar

مستخلص لحم البقر	3 جرام	Beef extract
مستخلص الخميرة	3 جرام	Yeast Extract
ببتون	15 جرام	Peptone
بروتيوز الببتون	5 جرام	Proteose Peptone
لاكتوز	10 جرام	Lactose
ساكاروز	10 جرام	Saccharose
دكستروز	1.0 جرام	Dextrose
كبريتات الحديد	0.2 جرام	Ferrous Sulfate
كلوريد الصوديوم	5 جرام	Sodium Chloride
كبريتات الصوديوم	0.3 جرام	Sodium Thiosulfate
أجار	12 جرام	Agar
أحمر الفينول	0.024 جرام	Phenol Red

19. وسط SIM Medium: SIM

مستخلص لحم البقر	3 جرام	Beef extract
ببتون	30 جرام	Peptone
حديد بالببتون	0.2 جرام	Peptonized iron
كبريتات الصوديوم	0.025	Sodium Thiosulfate
أجار	3 جرام	Agar

20. أجار الببتون والحديد Peptone iron Agar

ببتون	15 جرام	Peptone
بروتيوز الببتون	5 جرام	Proteose peptone
أمونيا الحديد	0.5 جرام	Ferric Ammonium citrate
كبريتات ثنائي البوتاسيوم	1.0 جرام	Dipotassium Sulfate
كبريتات الصوديوم	0.08 جرام	Sodium Thiosulfate
أجار	15 جرام	Agar

21. حساء النترات Nitrate Broth

مستخلص لحم البقر	3 جرام	Beef extract
ببتون	5 جرام	Peptone
نترات البوتاسيوم	1 جرام	Potassium Nitrate

22. حساء أحمر الفينول الأساسي Phenol Red Broth Base

مستخلص لحم البقر	1 جرام	Beef extract
بروتيوز الببتون رقم «3»	10 جرام	Proteose peptone No 3
كلوريد الصوديوم	5 جرام	Sodium Chloride
أحمر الفينول	0.018 جرام	Phenol Red

23. وسط الثايوقليكوليت Thioglycollate Medium

مستخلص الخميرة	5 جرام	Yeast Extract
كازيتون	15 جرام	Casitone
كلوريد الصوديوم	2.5 جرام	Sodium Chloride
سستين	0.25 جرام	L-Cystine
حامض الثايوقليكوليك	0.3 جرام	Thioglycollic acid
أجار	0.75 جرام	Agar
صبغة أزرق الميثيل	0.002 جرام	Methylene blue

24. أجار أستات الرصاص Lead Acetate Agar

ببتون	15 جرام	Peptone
بروتيوز الببتون	5 جرام	Proteose peptone
دكستروز	1 جرام	Dextrose
أستات الرصاص	0.2 جرام	Lead Acetate
كبريتات الصوديوم	0.08 جرام	Sodium thiosulfate
أجار	15 جرام	Agar

25. أجار الحديد Kligler iron Agar

مستخلص لحم البقر	3 جرام	Beef extract
مستخلص الخميرة	3 جرام	Yeast Extract
ببتون	15 جرام	Peptone
بروتيوز الببتون	5 جرام	Proteose peptone
لاكتوز	10 جرام	Lactose
دكستروز	1.0 جرام	Dextrose
كبريتات الحديد	0.2 جرام	Ferrous Sulfate
كلوريد الصوديوم	5 جرام	Sodium Choride

كبريتات الصوديوم	0.3 جرام	Sodium thiosulfate
أجار	12 جرام	Agar
أحمر الفينول	0.024 جرام	Phenol Red

26. أجار ثلاثي البوتيرين Tributyrin Agar

مستخلص لحم البقر	3 جرام	Beef extract
ببتون	5.0 جرام	Peptone
أجار	15 جرام	Agar
ثلاثي البوتيرين	10 مللي ليتر	Tributyrin
ماء مقطر	1000 مللي ليتر	Dist. Water

1. حضر الأجار المغذي NA حسب التعليمات على العلبة، عقم عند psi 15 لمدة 15 دقيقة.
2. في قنينة أخرى عقم 10 مل من Tributyrin لكل لتر عند psi 15 لمدة 15 دقيقة.
3. في خلاط معقم إعمل مستحلباً من Tributyrin والأجار السائل، ثم اسكب الوسط في صحون بتري بحيث تكون طبقة رقيقة (15 مل تقريباً).

27. أجار النشا Starch Agar

مستخلص اللحم	3.0 جرام	Beef extract
ببتون	5.0 جرام	Peptone
أجار	15.0 جرام	Agar
نشا (قابل للذوبان)	3.0 جرام	Starch (Soluble)
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

1. أضف الأجار المغذي (NA) إلى الماء حسب التعليمات على العلب.

2. أخلط بدون تسخين. النشا ـ يجب عدم إضافته إلى السائل الساخن أو المغلي.

3. أضف النشا (3 جرام) القابل للذوبان إلى الخليط من الأجار المغذي والماء.

4. سخن الآن Turn on the Heat.

5. سخن خليط Starch - NA إلى أن يغلي، ثم عقم عند 15 psi لمدة 15 دقيقة.

28. حساء تربتيكيز الصويا Trypticase Soy Broth

تربتيكيز	17 جرام	Trypticase
فايتون	3.0 جرام	Phytone
كلوريد الصوديوم	5.0 جرام	Sodium Chloride
فوسفات ثنائي البوتاسيوم	2.5 جرام	Dipotassium phosphate
جلوكوز	2.5 جرام	Glucose
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

29. أجار تربتيكيز الصويا Trypticase Soy Agar

نفس مكونات Trypticase Soy Broth بالإضافة إلى 15 جرام أجار.

30. الوسط البسيط المحدد كيميائياً Chemically defined (Synthetic) Medium

جلوكوز	2 جرام	Glucose
فوسفات البوتاسيوم	1 جرام	K_2HPO_4
كلوريد الأمونيوم	0.5 جرام	NH_4Cl
كبريتات المغنسيوم	0.2 جرام	$MgSO_5 . 7H_2O$
كلوريد الحديد	0.005 جرام	$Fe CL_2 . 6H_20$

ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

31. أجار الحركة Motility Agar

تربتوز	10 جرام	Tryptose
كلوريد الصوديوم	5 جرام	Sodium Chloride
أجار	5 جرام	Agar
ماء مقطر	1000 مللي لتر	Dist. Water

ملحق 2

الصبغات والكاشفات

Stains and Reagents

1. صبغة أحمر المثيل Methyl Red

أحمر المثيل	0.1 جرام	Methyl Red
كحول إيثيلي	300 مللي لتر	Ethyl Alkohol
ماء مقطر	200 مللي لتر	Dist. Water

● أذب الصبغة في الكحول ثم أضف الماء المقطر لجعله 500 مللي لتر.

2. صبغة أزرق الميثيلين القاعدية Loeffler's Alkaline Methylene Blue

محلول (أ):

كلوريد أزرق الميثيلين	0.3 جرام	Methylene Blue Chloride
كحول ايثيلي	30.0 مللي لتر	Ethyl Alkohol

(ب):

هيدروكسيد البوتاسيوم	0.01 جرام	KOH
ماء مقطر	100 مللي لتر	Dist. Water

● أخلط محلول (أ) مع محلول (ب).

3. صبغة أحمر كونقو Congo Red

أحمر كونقو	0.5 جرام	Congo Red
ماء مقطر	100 مللي لتر	Dist. Water

4. صبغة الجنسيان البنفسجي Crystal Violet (modified Hucker)

محلول (أ):

الجنسيان البنفسجي	2.0 جرام	Crystal Violet
كحول إيثيلي (% 95)	20 مللي لتر	Ethyl Alkohol

محلول (ب):

أكسالات الأمونيوم	0.8 جرام	Ammonium oxalate
ماء مقطر	80 مللي لتر	Dist. Water

- أخلط محلول (أ) مع محلول (ب). إحفظ المخلوط في درجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة قبل الاستعمال، بعد ذلك رشح المخلوط في قنينة خاصة بالصبغات.

5. محلول اليود (جرام): Gram's Iodine

يود	1.0 جرام	Iodine
يوديد البوتاسيوم	2.0 جرام	Potassium iodine
ماء مقطر	300.0 مللي لتر	Dist. Water

6. الكحول الإيثيلي (95%) Ethyl alkohol

- يستعمل كمزيل للصبغة Decolorizer في بعض طرق صبغ الميكروبات مثل الصبغ بطريقة جرام Gram's Staining.

7. صبغة الصفرانين Safranin

المحلول الأصلي Stock Solution

صفرانين	2.5 جرام	Safranin O
الكحول الإيثلي (% 95)	100.0 مللي لتر	Ethyl Alkohol

محلول الاستعمال Working Solution :

محلول أصلي	10 مللي لتر	Stock Solution
ماء مقطر	90 مللي لتر	Dist. Water

8. هيدروكسيد البوتاسيوم ـ كرياتين:

(W/V, %0.3) Creatine - (W/V, %40) Potassium Hydroxide

هيدروكسيد البوتاسيوم	4.0 جرام	Potassium Hydroxide
كرياتين	0.3 جرام	Creatine
ماء مقطر	100 مللي لتر	Dist. Water

- أذب هيدروكسيد البوتاسيوم في الماء المقطر بعناية مع التحريك، ثم أذب الكرياتين.

9. صبغة ليفسون للأسواط Leifson's Flagellar Stain

ثلاثة محاليل تحضر بالطريقة التالية:

محلول (أ):

- أذب 0.3 جرام من Pararosaniline Hydrochloride و 0.9 جرام Pararosaniline Acetate في 100 مللي لتر كحول إيثيلي (% 95). أترك المحلول ساكناً لمدة 24 ساعة.

محلول (ب):

- أذب 3 جرام Tannic Acid في 100 مللي لتر ماء مقطر.

محلول (ج):

- أذب 1.5 جرام ملح الطعام NaCl في 100 مللي لتر ماء مقطر.

- أخلط أحجاماً متساوية من المحاليل الثلاث واتركها ساكنة لمدة ساعتين.

• لا ترشح (يتكون راسب في قاع الإناء. هذا شيء طبيعي ولا يتعارض مع طبيعة عمل الصبغة). صبغة ليفسون Leifson يمكن أن تخزن في الثلاجة لمدة شهرين. القنينة المحتوية على الصبغة يجب أن تكون مقفولة بإحكام.

10. الكحول أيزوبروبيل Isopropyl Alkohol, 70%, V/V

الكحول أيزوبروبيل	700 مللي لتر	Isopropyl Alkohol
ماء مقطر	300 مللي لتر	Dist. Water

11. محلول ريسازورين Resazurin Solution

ريسازورين	قرص واحد (يحتوي على 11 ملليجرام صبغة).
ماء مقطر	200 مللتر (معقمة أو مغلية).

• عقّم أو اغلِ الماء المقطر (الحجم النهائي 200 ملليلتر ± 2 مللي لتر) في زجاجة مظلمة مغلقة. بينما يكون الماء ما زال ساخناً، أضف قرص الريسازورين Resazurin والذي يجب أن يذوب قبل أن يبرد المحلول. إحفظ المحلول في مكان مظلم وبارد. المحلول يجب أن يحضر أسبوعياً.

12. صبغة أزرق-القطن Lactophenol Cotton Blue

بلورات الفينول	20 جرام	Phenol Crystals (C.P.)
حامض الحليب	20 جرام	Lactic Acid (C.P.)
جليسيرين أو جليسيرول	40 مللي لتر	Glycerin (C.P.) or Glycerol
ماء مقطر	20 مللي لتر	Dist. Water
أزرق القطن	0.5 جرام	Cotton Blue (Aniline Blue)

• وحد المكونات حسب الترتيب، واخلط جيداً. خزن الصبغة في قنينة

بنية اللون ومحكمة الإقفال.

13. صبغة الكاربول فوكسين Ziehl's Carbol Fuchsin

فوكسين قاعدي	0.3 جرام	Basic Fuchsin
كحول إيثيلي	10 مللي لتر	Ethyl Alkohol, 95%
بلورات الفينول الذائبة	5 مللي لتر	Phenol, heat - melted Crystals
ماء مقطر	95 مللي لتر	Dist. Water

• أذب الفوكسين القاعدي في الكحول. سخن بلورات الفينول إلى 45 درجة مئوية لكي تذوب. أنقل يدوياً 5 مللي لتر من بلورات الفينول الذائبة إلى الماء واخلط جيداً. أخلط محلول الفوكسين القاعدي مع محلول الفينول واترك المخلوط ساكناً لعدة أيام. رشح الخليط قبل الاستعمال.

14. صبغة مانفال المعدلة: Modified Maneval's Stain

فوكسين	0.05 جرام	Fuchsin
كلوريد الحديد	3.0 جرام	Ferric Chloride
حامض الخليك	5.0 مللي لتر	Acetic Acid, glacial
فينول (سائل)	3.9 مللي لتر	Phenol, liquified (89 - 90%)
ماء مقطر	95 مللي لتر	Dist. Water

15. صبغة سودان أسود ب Sudan Black B

سودان أسود ب	0.3 جرام	Sudan Black B
الكحول إيثيلي	100 مللي لتر	Ethyl alkohol, 70%, w/v

• رج الخليط جيداً بين الحين والآخر خلال يوم التحضير، واترك هذا الخليط إلى اليوم التالي قبل الاستعمال.

16. كاشف كوفاك Kovac's Reagent

ألدهايد	5.0 جرام	Para - Dimethylaminobenzaldehyde
أميل الكحول	75 مللي لتر	Amyl (or butyl) alkohol
حامض الهيدروكلوريك المركز	25 مللي لتر	Hydrochoric acid, Concentrated

- أذب الألدهايد في الألكحول، ثم أضف الحامض إلى المحلول الألكحولي.

17. صبغة أخضر المالاكايت Malachite Green Stain

أخضر المالاكايت	5.0 جرام	Malachite Green
ماء مقطر	100 مللي لتر	Dist. Water

18. محلول ميثيل السيلولوز (10%) Methyl Cellulose %10

مسحوق ميثيل السيلولوز	10 جرام	Methyl Cellulose Powder
ماء الصنبور	100 مللي لتر	Tap Water

- سخن ماء الصنبور إلى 85 درجة مئوية. أضف مسحوق ميثيل السيلولوز. برد الخليط في حمام ثلج إلى حوالي 5 درجة مئوية مع التحريك السريع المنتظم. هذا المحلول ثابت في درجة حرارة الغرفة. إحفظ الخليط في قنينة مغلقة ببوغ Screw Cap Bottle.
- خفف هذا المخلوط الأصلي 1:5 للاستعمال للكشف على الحيوانات الأولية Protozoans. أضف الماء ببطء وحرك بانتظام عند تخفيف الخليط لمنع تكون كتل في المخلوط.

19. محلول يود لوقول Lugol's Iodine

يوديد البوتاسيوم	10 جرام	Potassium iodide, C.P
يود	5 جرام	Iodine, C.P
ماء مقطر	100 مللي لتر	Dist. Water

● أذب يوديد البوتاسيوم في الماء المقطر، ثم أضف ببطء بلورات اليود ورج الخليط عدة مرات حتى يذوب اليود. رشح الخليط وانقله إلى زجاجة ثم أقفل الزجاجة بإحكام للتخزين والاستعمال عند الحاجة.

20. محلول الكحول ـ حامض Acid - Alkohol

حامض الهيدروكلوريك المركز	3.0 مللي لتر	Hydrochloric Acid, Conc.
الكحول إثيلي	97.9 مللي لتر	Ethyl alcohol, 95%

21. ألفا ـ نفثول Alpha - Naphthol, 5%, W/V

ألفا ـ نفثول	5.0 جرام	Alpha - Naphthol
الكحول إيثيلي	100 مللي لتر	Ethyl alcohol

● احفظ الخليط في قنينة محكمة داخل الثلاجة.

22. أحمر الفينول: Phenol Red, 0,02%, W/V

أحمر الفينول	0.1 جرام	Phenol Red
هيدروكسيد الصوديوم	2.82 مللي لتر	NaOH 0.1 N
الكحول إيثيلي	250 مللي لتر	Ethyl alcohol, 50%, q.s. to

● إهرس أحمر الفينول في الصوديوم، ثم أضف الكحول الإيثيلي إلى حجم 250 مللي لتر (الحجم الكلي للمخلوط). مخلوط الصيغة هذا يضاف إلى أوساط التخمر قبل التعقيم للحصول على تركيز نهائي مقداره 18 إلى 20 ملليجرام لكل لتر من الوسط.

المراجع

References

1 - Atlas, R. M, 1988. Microbiology: Fundamentals and Applications, 2nd ed., Macmillan Publishing Company, New York.

2 - Barnes, I. J; H. W. Seeley, Jr. and P.J. VanDemark. 1974. Microbes and Man, a Laboratory Manual for Students in the Health Sciences, H.W. Freeman and Co., San Francisco.

3 - Beishir, L. 1983. Microbiology in Practice, individualized Instruction for the allied Health Sciences 3rd. ed., Harper and Row, Publishers New York.

4 - Benson H.J. 1973. Microbiology Applications, a Laboratory Manual in general Microbiology. 2nd ed., WM. C. Brown Co. Publishers, Dubuque, Iowa.

5 - Black, J.G. 1999. Microbiology: Principles and Exploration, 4th ed., Prentice Hall, New Jersey.

6 - Brock, T.D.; M. T. Madigan; J. M. Martinko and J. Parker. 1994. Biology of Microorganisms, 7th. ed., Prentice - Hall International Inc, New. Jersey.

7 - Buffaloe, N.D. and B.V. Ferguson. 1981. Laboratory Manual of Microbiology, 2nd ed., Houghton Mifflin Co., Boston.

8 - Cheesbrough, M. 1992. Medical Laboratory Manual for Tropical Countries. Vol. II: Microbiology. Butterworth - Heinemann, Oxford.

9 - Colome, J.S., A. M. Kubinski, R.J. Cano and D.V. Grady. 1986. Laboratory Exercises in Microbiology, west Publishing

Co., St. Paul.

10 - Deal, S.J., V.F. Gerencser and J.M. Slack. 1976. Experimental Microbiology for the Health Science, 4th ed., Burges Publishing Co., Minneapolis, Minnesota.

11 - Despommier, D.D. and J.W. Karapelow. 1987. Parasite Life Cycles, Springer - Verlag, New York.

12 - Difco Laboratories. 1953. Difco Manual for dehydrated Culture Media and reagents, 9th ed., Difco Laboratories Incorporated, Detroit, Michigan.

13 - Drews, G.. 1974. Mikrobiologishes Practikum, 2^{md} ed., Springer Verlag, Berlin.

14 - Finegold, S.M. and E.J. Baron. 1986. Diagnostic Microbiology. 7th., ed. the C.V. Mosby Company, St. Louis.

15 - Gerhardt, P.; R.G.E Murray; R.N. Costilow; E.W. Nester; W.A. Wood; N.R. Krieg and G.B. Phillips. 1981. Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, DC.

16 - Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and T. Williams 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.

17 - Jeffrey, H.C; R.M. Leach and G.O. Cowan. 1991. Atlas of Medical Helminthology and Protozoology. 3rd edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, UK.

18 - Smith, A.L. 1981. Microbiology, Laboratory Manual and Workbook, 5th ed., the C.V. Mosby Co., St. Louis, Missouri.

19 - Steeley, Jr., H.W. and P.J. VanDemark. 1972. Microbes in Action, A Laboratory Manual of Microbiology, 2nd ed., W.H. Freeman and Co., San Francisco, California.

20 - Wistreich, G.A. and M.D. Lechtman. 1973. Laboratory Exercises in Microbiology, Glencoe Press, New York.



المؤلف في سطور:

تحصل المؤلف على درجة البكالوريوس و الماجستير من جامعة Eberhard - Karls Universität بمدينة توبنجن Tübingen بألمانيا الغربية عام 1977 في مجال علوم الكائنات الدقيقة Microbiology و كان عنوان أطروحة الماجستير :

" Optimierung der Ketomycin- und 3 - Cyclohexenylglycinproduktion bei Streptomyces Tendae Ettlinger "

ثم التحق بقسم النبات - كلية العلوم - جامعة قار يونس بمدينة بنغازي كعضو هيئة التدريس عام 1978 ، واصل دراسة الدكتوراه عام 1979 بالولايات المتحدة الأميريكية و تحصل على درجة الدكتوراه .PH. D ايضاً في مجال علوم الكائنات الدقيقة من جامعة شمال ولاية تكساس North Texas State University بمدينة دنتون Denton عام 1985 وكان عنوان بحث الدكتوراه :

" Degradation of Humic Subctances by aquatic Bacteria "

نشرت له عدة بحوث في مجال علوم الكائنات الدقيقة (البكتيريا) في عدة مجلات محلية و خارجية كما أشرف على عدة طلبة ماجستير مجالات اهتمامه: البكتيريا الطبية Medial Bacteriology المضادات الحيوية Antibiotics والتحلل الحيوي Biodegradation يشغل درجة استاذ .Prof بقسم النبات منذ عام 1995.